



Impact de la formulation et du mélange de deux pesticides (mésotrione et tébuconazole) sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes

Mohamed Youness

► To cite this version:

Mohamed Youness. Impact de la formulation et du mélange de deux pesticides (mésotrione et tébuconazole) sur leur biodégradation et la croissance de microorganismes. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013. Français. NNT : 2013CLF22378 . tel-00926895

HAL Id: tel-00926895

<https://theses.hal.science/tel-00926895>

Submitted on 10 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'Ordre : D. U. 2378

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL

(U.F.R. Sciences et Technologies)

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N° : 761

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

(Spécialité : Chimie Organique Biologique)

Par

Mohamed YOUNESS

(Diplômé du Master en Chimie des Substances Naturelles et Médicaments)

IMPACT DE LA FORMULATION ET DU MÉLANGE DE DEUX PESTICIDES (MÉSOTRIONE ET TÉBUCONAZOLE) SUR LEUR BIODÉGRADATION ET LA CROISSANCE DE MICROORGANISMES

Soutenue publiquement le 27 Septembre 2013, devant la commission d'examen :

Président : I. BATISSON, MCF, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand 2

Rapporteurs : B. COMBOURIEU, Professeur, Université Lyon 1
F. MARTIN-LAURENT, DR-INRA, INRA Dijon

Examineur : P. BESSE-HOGGAN, DR-CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Fd 2

Remerciements

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifesté à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de *«l'apprenti-chercheur»*.

En premier lieu, je tiens à remercier grandement ma directrice de thèse, Madame Pascale BESSE-HOGGAN pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger cette recherche. Sincèrement, grâce à elle, j'ai pu améliorer ma formation académique bien sûr, mais nos discussions m'ont également permis de beaucoup progresser sur mon développement personnel. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié sa grande disponibilité pour la relecture et la correction des documents que je lui ai adressés. La justesse de ses critiques a été très constructive et utile. Mises à part ses contributions de fond, elle a eu la pénible tâche de corriger mon français maladroit ! Je lui exprime ma très profonde gratitude.

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur Fabrice MARTIN-LAURENT, Directeur de Recherches à l'INRA de Dijon, et à Monsieur Bruno COMBOURIEU, Professeur à l'Université de Lyon 1, de prendre sur leur temps précieux pour examiner ce travail et d'en être les rapporteurs.

J'adresse aussi mes remerciements à Madame Isabelle BATISSON, Maître de Conférences à l'Université Blaise Pascal, d'avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de ce jury.

Je remercie Madame Martine SANCELME pour sa grande disponibilité, son aide précieuse en microbiologie, et pour la préparation des nombreuses cultures microbiennes

réalisées tout au long de ce travail de thèse. Je la remercie pour sa gentillesse, ses conseils scientifiques et humains.

Je tiens à remercier Madame Anne-Marie DELORT, pour m'avoir accueilli au sein de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF), UMR-CNRS 6296.

Je remercie également chaleureusement Monsieur Mounir TRAÏKIA, Madame Anne-Sophie BIESSE-MARTIN et Monsieur Régis EGROT pour leur soutien en RMN et les nombreux conseils prodigués, ainsi que Mme Angélique ABILA pour sa patience et son aide en spectrométrie de masse.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe Synthèse et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB), et je pense particulièrement aux étudiants qui occupaient le même bureau que moi, Antony, Mickaël, Muriel, Edith et tous les stagiaires et les post doctorants qui sont passés pendant ces années. Je les remercie pour l'échange quotidien enrichissant et pour leur gentillesse.

Je termine en remerciant les personnes qui ne vivent pas avec moi au travail mais qui participent à ma vie personnelle. Je remercie mes amis avec qui je profitais du peu de temps disponible pour échanger des idées, se balader, et surtout jouer au foot. Je n'oublie pas mes amis lointains avec qui je partage de profonds sentiments d'amitié, de manque et un grand souhait de se réunir un jour...

Mes derniers mots, je les adresse à ma famille partagée en deux: ma grande famille au Liban : grâce à elle, j'ai eu la chance d'arriver en France pour poursuivre mes études et vivre une grande expérience professionnelle et humaine, merci pour tous les sacrifices faits pour que j'arrive jusqu'ici. Le plus grand merci est adressé à mon père, le grand Moustafa. Sans lui, rien n'était possible, merci pour le soutien à tous les niveaux. Merci à ma mère Souraya, mes sœurs, Racha, Rana et Samar, et mon frère Ali qui m'ont soutenu malgré la grande distance.

Enfin, à toi mon amour, Zeina, il n'y a pas des mots qui expliquent mes sentiments d'amour, de respect et d'appréciation, de tout le bonheur que tu m'as emporté depuis ton apparition dans ma vie. Je te remercie surtout pour ta compréhension ces derniers mois qui n'étaient pas du tout faciles. Que dieu nous protège notre petit ange le petit Moustapha, certes, il ne comprend rien maintenant mais j'espère qu'il sera fier un jour de son père, comme je le suis du mien.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
-----------------------------------	----------

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
-----------------------------------	----------

La famille des benzoylcyclohexane-1,3-diones (tricétones) : Cas de la mésotrione.....	9
--	----------

I. Origine de la famille des benzoylcyclohexane-1,3-diones	9
II. Mode d'action des composés de la famille des cyclohexanediones	13
III. La mésotrione.....	16
III.1. Caractéristiques et utilisations agronomiques	16
III.2. Métabolisme de la mésotrione chez le rat et la souris.....	18
III.3. Devenir de la mésotrione dans l'environnement.....	20
III.3.1. Processus de rétention dans les sols	20
III.3.2. Transformation par voie photochimique	21
III.3.3. Transformation par voie biologique	24
III.4. Impact de la mésotrione - Toxicité.....	27

La famille des triazoles : Cas du tébuconazole	29
---	-----------

I. La famille des triazoles	29
II. Mode d'action des composés de la famille des triazoles.....	33
III. Le tébuconazole.....	35
III.1. Caractéristiques et utilisations agronomiques	35
III.2. Métabolisme du tébuconazole chez les mammifères.....	37
III.3. Devenir du tébuconazole dans l'environnement.....	39
III.3.1. Processus de rétention dans les sols	39
III.3.2. Transformation par voie photochimique	41
III.3.3. Transformation par voie biologique	43
III.4. Impact du tébuconazole - Toxicité.....	46

Impact de la formulation et de l'utilisation de cocktails de pesticides sur leur devenir	49
---	-----------

I. Impact de la formulation et des adjuvants.....	51
II. Impact des mélanges de pesticides sur leur devenir et leur toxicité	53
II.1. Impact sur les processus de photodégradation	54
II.2. Impact sur les processus de biodégradation par des communautés mixtes	54
II.3. Comparaison de la dissipation d'un pesticide seul ou en mélange dans les sols.....	56
II.4. Impact sur la toxicité vis-à-vis de différents organismes.....	60

MATERIELS ET METHODES.....	65
-----------------------------------	-----------

Généralités.....	67
-------------------------	-----------

I. Composés chimiques	67
II. Conditions de culture et expériences de dissipation	67
II.1. Conditions de culture	67
II.2. Incubation en présence de pesticides.....	68
III. Tests de toxicité des matières actives et des formulations sur la croissance de souches microbiennes..	68
III.1. Souches testées	68
III.2. Conditions de culture	69
III.3. Suivi de la croissance des différentes souches microbiennes.....	69

IV. Techniques d'analyse pour le contrôle des cinétiques de dissipation	69
IV.1. Analyses par HPLC.....	69
IV.2. Analyse par RMN ¹ H.....	70
IV.3. Quantification par RMN ¹ H.....	70
Etude de la mésotrione et de sa formulation (Callisto®).....	71
I. Préparation des solutions de mésotrione et Callisto®	71
I.1. Préparation des solutions de mésotrione	71
I.2. Préparation des solutions de Callisto®	71
II. Souches dégradantes étudiées	72
III. Incubation de la mésotrione et du Callisto avec les souches étudiées	72
IV. Comparaison de la biodégradation de la mésotrione pure par <i>E. coli</i> ATCC 11303 dans l'eau de Volvic et dans un milieu minéral	74
V. Contrôle des cinétiques de dissipation de la mésotrione pure ou formulée.....	75
V.1. Analyses par HPLC.....	75
V.2. Analyses par RMN ¹ H.....	76
VI. Identification du métabolite inconnu formé lors de la biodégradation de la mésotrione par les souches <i>Bacillus</i> sp. IB1, <i>Bacillus</i> sp. IB11 et <i>E. coli</i> ATCC 11303	76
VI.1. Préparation de l'échantillon pour les analyses par RMN.....	76
VI.1.1. Biodégradation de la mésotrione par <i>Bacillus</i> sp. IB11.....	77
VI.1.2. Test de lyophilisation pour concentrer le métabolite inconnu.....	77
VI.1.3. Concentration par évaporation sous vide avec un Speed Vac.....	77
VI.2. Analyses par RMN 2D.....	78
VI.2.1. Expérience COSY ¹ H- ¹ H (Correlation Spectroscopy)	78
VI.2.2. Expérience TOCSY ¹ H- ¹ H (Total Correlation Spectroscopy).....	78
VI.2.3. Expérience NOESY ¹ H- ¹ H (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)	79
VI.2.4. Expérience HMQC ¹ H- ¹³ C (Heteronuclear Multi-Quantum Correlation).....	79
VI.2.5. Expérience HMBC (Multiple-Bond Correlation)	80
VI.3. Analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)	80
Etude du tébuconazole et de sa formulation (Balmora®)	83
I. Préparation des solutions de tébuconazole et de Balmora®	83
I.1. Préparation des solutions de tébuconazole	83
I.1.1 Préparation des solutions de tébuconazole dans l'eau	83
I.1.2 Préparation des solutions de tébuconazole dans l'éthanol	83
I.2. Préparation des solutions de Balmora®	84
II. Criblage de souches dégradantes.....	84
III. Incubation du tébuconazole avec les souches dégradantes	86
III.1. Suivi cinétique de la dissipation du tébuconazole pur ou formulé	86
III.2. Comparaison des cinétiques de biodégradation du tébuconazole pur par <i>Bacillus</i> sp. 3B6 dans l'eau de Volvic et dans un milieu minéral contenant une source d'azote.....	87
III.3. Suivi de l'énantiosélectivité de la biodégradation du tébuconazole par <i>Bacillus</i> sp. 3B6	87
III.4. Suivi cinétique de la biodégradation du tébuconazole : Extraction du culot bactérien	89
IV. Contrôle des cinétiques de biodégradation du tébuconazole pur ou formulé par HPLC.....	89
V. Identification des métabolites formés lors de la biodégradation du tébuconazole.....	90
V.1. Essai quantitatif : Incubation du tébuconazole avec les souches dégradantes	90
V.2. Analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).....	91
V.3. Analyses par RMN 1D.....	92
V.3.1 RMN ¹ H	92

V.3.2	RMN ¹³ C.....	94
V.4.	Analyses par RMN 2D.....	94
Etude du mélange de pesticides purs ou formulés		95
I.	Choix des souches testées	95
II.	Incubation de la mésotrione et du tébuconazole, purs ou formulés, avec la souche <i>Bacillus</i> sp. 3B6.....	95
III.	Incubation de la mésotrione et du tébuconazole, purs ou formulés, avec la souche <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 21244	95
IV.	Contrôle des cinétiques de biodégradation du mélange (mésotrione et tébuconazole) par HPLC.....	96
RESULTATS/ DISCUSSION		97
Etude de la biodégradation de la mésotrione, pure et formulée, par différentes souches bactériennes : vers un mécanisme commun de biodégradation		99
I.	Etude comparative des cinétiques de dissipation de la mésotrione pure par les souches bactériennes testées.....	100
I.1.	Etude comparative des cinétiques de dissipation de la mésotrione pure par sept souches de <i>Bacillus</i> sp.....	100
I.2.	Etude comparative des cinétiques de dissipation de la mésotrione pure par des souches Gram négatif.....	104
I.3.	Conclusion	108
II.	Etude comparative des voies métaboliques de biodégradation de la mésotrione pure par les souches bactériennes testées.....	109
II.1.	Vérification de l'adéquation quantitative entre analyses par HPLC et RMN ¹ H.....	110
II.1.1	Suivi et quantification de la mésotrione.....	111
II.1.2	Suivi et quantification du métabolite principal, l'AMBA	111
II.1.3	Suivi des autres métabolites.....	112
II.2.	Suivi de l'évolution des métabolites lors de la biotransformation de la mésotrione pure par <i>Bacillus</i> sp. 3B6 ..	113
II.3.	Etude comparative de l'évolution des métabolites lors de la biotransformation de la mésotrione pure par sept souches de <i>Bacillus</i> sp.	117
II.3.1	Souches de <i>Bacillus</i> sp. les plus efficaces	117
II.3.2	Souches de <i>Bacillus</i> sp. ne dissipant que partiellement la mésotrione dans nos conditions d'expérience.....	122
II.3.3	Conclusion sur les souches de <i>Bacillus</i> sp.	124
II.4.	Etude comparative du comportement des métabolites lors de la biotransformation de la mésotrione pure par <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303 et <i>Pantoea</i> sp. 5B12.....	127
II.5.	Conclusion	130
III.	Essai d'identification du métabolite inconnu observé lors de la biodégradation de la mésotrione pure par LC/MS et RMN 2D.....	131
III.1.	Analyses par LC/ESI-MS	132
III.2.	Analyses par RMN 2D.....	133
III.3.	Hypothèses sur la structure du métabolite inconnu Mi	137
IV.	Etude de l'effet de la formulation (Callisto®) sur la biodégradation de la mésotrione par les souches bactériennes dégradantes	141
IV.1.	Etude de la stabilité du Callisto® dans les conditions de nos expériences	143
IV.2.	Etude comparative de la biodégradation de la mésotrione pure et formulée par les souches de <i>Bacillus</i> sp.....	143
IV.2.1	Biodégradation de la mésotrione pure et formulée par <i>Bacillus</i> sp. 3B6	143

IV.2.2	Biodégradation de la mésotrione pure et formulée par <i>Bacillus</i> sp. IB11	146
IV.2.3	Comparaison des deux souches <i>Bacillus</i> sp. 3B6 et <i>Bacillus</i> sp. IB11	147
IV.3.	Etude comparative de la biodégradation de la mésotrione pure et formulée par deux souches Gram négatif.....	149
IV.3.1	Biodégradation de la mésotrione pure et formulée par <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303.....	149
IV.3.2	Biodégradation de la mésotrione pure et formulée par <i>Pantoea</i> sp. 5B12	154
IV.4.	Conclusion	157
V.	Conclusion	157

Etude de la biodégradation du tébuconazole, pur et formulé159

I.	Recherche de microorganismes capables de dégrader le tébuconazole pur.....	159
II.	Etude de la biodégradation du tébuconazole pur par la souche <i>Bacillus</i> sp. 3B6.....	161
II.1.	Cinétiques de dissipation du tébuconazole pur.....	161
II.2.	Suivi de l'énantiosélectivité de la biotransformation du tébuconazole	164
II.3.	Modifications des conditions de dissipation du tébuconazole	168
II.4.	Identification des métabolites formés au cours de la biodégradation.....	172
II.4.1	Analyses par HPLC et LC/(+)ESI/MS	172
II.4.2	Analyses par RMN	177
II.5.	Evolution des métabolites formés dans différentes conditions de biodégradation	184
II.6.	Conclusion sur les essais de biodégradation du tébuconazole pur par la souche <i>Bacillus</i> sp. 3B6.....	186
III.	Etude de la biodégradation du tébuconazole pur par les souches de <i>Pseudomonas</i>	186
III.1.	Etude de la biodégradation du tébuconazole par <i>Pseudomonas</i> sp. C12B ATCC 43468	187
III.1.1	Cinétiques de dissipation.....	187
III.1.2.	Influence de la biomasse sur la cinétique de dissipation du tébuconazole par <i>Pseudomonas</i> sp. C12B	188
III.1.3.	Identification des métabolites formés	189
III.2.	Etude de la biodégradation du tébuconazole pur par <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 21244	189
III.2.1.	Cinétiques de dissipation.....	189
III.2.2.	Influence de la biomasse sur la cinétique de dissipation du tébuconazole par <i>Pseudomonas putida</i>	191
III.2.3.	Identification des métabolites formés	192
III.3.	Conclusion sur les essais de biodégradation du tébuconazole pur par les souches de <i>Pseudomonas</i>	196
IV.	Etude de l'effet de la formulation (Balmora®) sur la biodégradation du tébuconazole par les souches bactériennes dégradantes	197
IV.1.	Etude comparative de la biodégradation du tébuconazole pur et formulé (Balmora®) par la souche <i>Bacillus</i> sp. 3B6	199
IV.2.	Etude comparative de la biodégradation du tébuconazole pur et formulé (Balmora®) par la souche <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 21244.....	205
V.	Conclusion	207

Impact de la formulation des pesticides, Callisto® et Balmora®, sur la croissance de souches microbiennes209

I.	Etude comparative de la croissance de souches bactériennes et de levure en présence de mésotrione pure ou formulée (Callisto®)	210
I.1.	Croissance de souches bactériennes Gram positif.....	210
I.1.1	Courbes de croissance de <i>Bacillus</i> sp. 3B6 en présence de mésotrione pure ou formulée. 211	
I.1.2	Courbes de croissance de <i>Bacillus</i> sp. IB11 en présence de mésotrione pure ou formulée 213	

I.1.3	Courbes de croissance de <i>Bacillus</i> sp. IB4 en présence de mésotrione pure ou formulée..	215
I.1.4	Courbes de croissance de <i>Bacillus</i> sp. 7B11 en présence de mésotrione pure ou formulée.....	217
I.1.5	Conclusions.....	218
I.2.	Croissance de souches bactériennes Gram négatif.....	219
I.2.1	Courbes de croissance d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303 en présence de mésotrione pure ou formulée.....	219
I.2.2	Courbes de croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17504 en présence de mésotrione pure ou formulée.....	221
I.2.3	Conclusions.....	222
I.3.	Croissance d'une souche de levure, <i>Candida albicans</i> CIP 444.....	224
I.4.	Conclusions.....	225
II.	Etude comparative de la croissance de souches bactériennes en présence de tébuconazole pur ou formulé (Balmora®)	226
II.1.	Croissance de souches bactériennes Gram positif.....	227
II.1.1	Courbes de croissance de <i>Bacillus</i> sp. 3B6 en présence de tébuconazole pur ou formulé..	227
II.1.2	Courbes de croissance de <i>Bacillus</i> sp. IB4 en présence de tébuconazole pur ou formulé...	229
II.1.3	Conclusions	230
II.2.	Croissance de souches bactériennes Gram négatif.....	231
II.2.1	Courbes de croissance de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 21244 en présence de tébuconazole pur ou formulé.....	231
II.2.2	Courbes de croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17504 en présence de tébuconazole pur ou formulé	232
II.2.3	Courbes de croissance d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303 en présence de tébuconazole pur ou formulé.....	234
II.2.4	Conclusions	235
II.3.	Croissance d'une souche de levure, <i>Candida albicans</i> CIP 444.....	236
II.4.	Conclusions.....	238
III.	Conclusions générales	238

Impact du mélange de deux pesticides, la mésotrione et le tébuconazole, purs ou formulés, sur leur biodégradation et la croissance de souches bactériennes243

I.	Etude de l'effet du mélange sur la souche <i>Bacillus</i> sp. 3B6 dégradant la mésotrione et le tébuconazole.....	244
I.1.	Effet du mélange sur la biodégradation des deux pesticides	244
I.1.1	Biodégradation en conditions classiques	244
I.1.2	Influence de la biomasse.....	249
I.2.	Effet du mélange de deux pesticides sur la croissance bactérienne	254
I.2.1	Effet du mélange de pesticides purs	254
I.2.2	Effet du mélange de pesticides formulés.....	256
I.3.	Conclusions.....	258
II.	Etude de l'effet du mélange sur des souches bactériennes dégradant la mésotrione mais pas le tébuconazole : <i>Bacillus</i> sp. IB10, <i>Bacillus</i> sp. IB11 et <i>Escherichia coli</i> ATCC 11303.....	258
II.1.	Effet du mélange sur la biodégradation des deux pesticides par <i>Bacillus</i> sp. IB10.....	259
II.2.	Effet du mélange sur la biodégradation des deux pesticides par <i>Bacillus</i> sp. IB11.....	262
II.3.	Effet du mélange sur la biodégradation des deux pesticides par <i>E. coli</i> ATCC 11303	265
II.4.	Conclusions.....	268
III.	Etude de l'effet du mélange sur une souche bactérienne dégradant le tébuconazole mais pas la mésotrione : <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 21224.....	268

III.1.	Effet du mélange de deux pesticides sur la biodégradation du tébuconazole	269
III.2.	Effet du mélange de deux pesticides sur la croissance de <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 21244 ...	270
IV.	Conclusions.....	274

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 277

Conclusions279

Perspectives.....285

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 289

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

L'usage des pesticides a constitué une avancée importante dans la maîtrise des ravageurs, des maladies parasitaires et des mauvaises herbes en agriculture. Ces produits ont largement facilité les conditions de travail et de production des agriculteurs et ont permis une sécurisation incontestable de la production alimentaire. La France est actuellement le premier consommateur européen de produits phytosanitaires et le quatrième à l'échelle mondiale (après les Etats-Unis, le Japon et le Brésil) avec une quantité vendue voisine de 63 000 tonnes en 2011 (soit 5,1 kg de pesticide à l'hectare), dont près de 55 % d'herbicides et 35 % de fongicides [UIPP, 2012]. Cependant l'usage de ces produits est aussi à l'origine de nuisances induites : pollutions des eaux, induction d'organismes résistants, impact sur la faune et la flore, appauvrissement des sols ... La contamination des eaux de surface et des eaux d'alimentation par des micropolluants organiques est un problème récurrent. A l'heure actuelle, 91% des eaux de surface (à partir de 2889 stations de surveillance) et 70% des eaux souterraines (à partir de 2321 stations de surveillance) sont contaminées par au moins un pesticide [Dubois et Lacouture, 2011]. En absence de méthode de lutte alternative applicable rapidement à grande échelle, l'usage des pesticides en agriculture devrait perdurer encore pendant plusieurs décennies. Cependant, la prise de conscience sociétale des dangers des pesticides a poussé les Autorités à adopter différentes réglementations au niveau européen ou national: Directive Cadre sur l'eau qui a pour objectif d'atteindre en 2015 « un bon état chimique et écologique des eaux » (2006/118/CE ; 2000/60/CE, DCE), Directive « Ecophyto 2018 » visant « à réduire de 50% l'apport de pesticides d'ici 2018 » mise en place suite au Grenelle de l'Environnement de 2007 Cependant on peut constater que les ventes ont continué de grimper de 2,6 % entre 2008 et 2011, ce qui rend les objectifs fixés de plus en plus inatteignables... Seules les substances les plus dangereuses ont fortement diminué... parce que l'Union Européenne (UE) a imposé le retrait du marché de 53 d'entre elles.

Il reste donc beaucoup de travail de terrain pour convaincre les agriculteurs – et aussi les jardiniers et services municipaux - de moins consommer, mais aussi beaucoup de

recherche plus fondamentale à effectuer pour comprendre en détail les mécanismes des différents processus qui régissent leur devenir dans l'environnement en fonction du milieu, d'identifier les produits de dégradation potentiellement formés et d'étudier la toxicité de l'ensemble de ces composés dans différentes situations. Si maintenant de nombreuses études ont été publiées sur le devenir et la toxicité ou écotoxicité, notamment d'herbicides, tous les facteurs n'ont pas été pris en compte. En effet, depuis les directives visant à diminuer les doses de pesticides épandues, plusieurs stratégies se sont développées pour atteindre cet objectif en augmentant l'efficacité des matières actives par du « design » de formulation ou par l'utilisation de cocktails de pesticides lors d'un épandage unique ou dans une programmation séquentielle rapprochée dans le temps. Ainsi les adjuvants et les additifs des formulations sont prévus par exemple, pour augmenter la solubilité, diminuer la taille des gouttelettes lors de la pulvérisation et avoir ainsi une meilleure répartition sur la cible ou éviter la dégradation trop rapide de la matière active dans les conditions environnementales, mais l'impact de tous ces composés présents dans la formulation ne sont que rarement pris en compte lors des études de devenir. De même, pour les nouvelles pratiques agricoles visant à pulvériser des mélanges de pesticides ou à les épandre de manière séquentielle rapprochée afin d'augmenter l'efficacité en élargissant la gamme de nuisibles ciblés, les effets synergiques, inhibiteurs ou neutres de ces mélanges de pesticides, épandus en même temps ou retrouvés dans les sols et/ou les eaux simultanément du fait de la persistance de certains, ne sont que très rarement pris en compte.

Notre travail de thèse s'est partiellement inscrit dans le cadre d'une action de recherche du CPER Environnement intitulée « Devenir et impact de produits phytosanitaires en Limagne ». Cette plaine agricole, proche de Clermont Ferrand, est une terre de cultures céréalières (maïs et blé) très fertile avec des rendements comparables à ceux de la Beauce et de la Brie. Dans le cadre de ce programme de recherche, plusieurs produits phytosanitaires d'intérêt ont été choisis pour leur large utilisation et le peu de données disponibles dans la littérature.

Notre travail de thèse s'est donc focalisé sur deux de ces pesticides : la mésotrione herbicide sélectif du maïs, appartenant à la famille des tricétones, commercialisé depuis 2001 en France et le tébuconazole, fongicide du blé, appartenant à la famille des triazoles. Il a eu pour objectif, après avoir établi les voies métaboliques de biodégradation de ces deux pesticides, par des souches isolées dégradantes, d'étudier l'impact des formulations et du

mélange de ces deux composés, sous forme de matière active ou de formulations, sur leur biodégradation et sur la croissance de microorganismes (toxicité). En effet, la biodégradation est un processus essentiel du devenir de pesticides dans l'environnement, pouvant conduire à des produits de dégradation (métabolites) ayant des propriétés physico-chimiques et biologiques (toxicité) complètement différentes de la molécule mère. Il est donc essentiel de connaître les potentiels métabolites toxiques qui pourraient s'accumuler dans le milieu et impacter les communautés microbiennes.

Au cours de notre travail de thèse, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la généralisation du mécanisme de biodégradation de la **mésotrione**, décrit précédemment dans le cadre de la thèse de S. Durand au sein de notre laboratoire avec la souche *Bacillus* sp. 3B6, à plusieurs autres souches de *Bacillus* mais aussi à des souches Gram négatif. Un schéma métabolique de biodégradation du tébuconazole par différentes souches bactériennes dégradantes a également été mis en place. Nous avons voulu, au cours de notre travail de thèse, essayer de généraliser le schéma métabolique proposé pour d'autres souches bactériennes Gram positif et négatif, isolées de sols ou issues d'un criblage de notre souchothèque. Le **tébuconazole**, lui, est un des fongicides les plus efficaces pour lutter contre les fusarioses, maladies courantes du blé, causées par certains champignons décomposeurs présents dans les sols. Il est également largement utilisé dans le traitement des bois. Ce fongicide est connu pour sa persistance dans l'environnement. Peu d'études ont porté sur sa biodégradation et aucun schéma métabolique de biodégradation par des bactéries n'a été détaillé jusqu'alors.

Une fois les schémas métaboliques de chaque pesticide caractérisés, nous nous sommes focalisés sur l'impact des formulations sur leur biodégradation respective, en termes de cinétiques et de modulation des voies métaboliques de dégradation, mais aussi sur la croissance de différents microorganismes dégradant ou non. Nous avons terminé cette étude en testant les effets du mélange de ces deux pesticides, purs ou formulés, sur leur biodégradation en utilisant des souches dégradant un seul de ces pesticides ou les deux.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La famille des benzoylcyclohexane-1,3-diones (tricétones) : cas de la mésotrione

I. Origine de la famille des benzoylcyclohexane-1,3-diones

En 1977, des chercheurs de la firme agro-pharmaceutique Zeneca (Californie) se sont intéressés à l'activité herbicide naturelle d'une plante ligneuse ornementale d'origine australienne de la famille des Myrtacées sous laquelle très peu d'adventices poussaient : *Callistemon citrinus*. Après analyses du sol et des diverses parties de la plante, ils ont mis en évidence la présence d'une phytotoxine naturelle dans des exsudats de sol (provenant très certainement des racines de la plante): la leptospermone, composé tétracétonique (Figure 1).

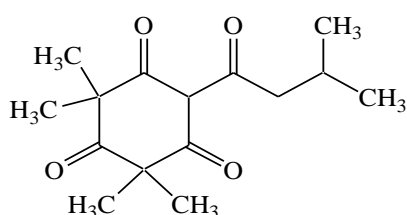


Figure 1 : Structure de la leptospermone présente dans la plante *Callistemon citrinus*

Cette molécule, efficace sur de nombreuses espèces d'adventices mais pas sur le maïs, ne présentait cependant qu'une activité herbicide modérée (1000 g/ hectare). Elle a été brevetée en 1980 [Gray *et al.*, 1980]. D'autres tricétones naturelles ont été isolées depuis lors, toutes synthétisées par des plantes de la famille des *Myrtacées* : flavesone, isoleptospermone et grandiflorone (Figure 2). Ces molécules comptent pour une part significative des huiles de ces plantes. Leur(s) rôle(s) naturel(s) n'a(ont) pas encore été clairement établi(s) [Owens *et al.*, 2013] mais ces phytotoxines présentent une grande variété d'activités biologiques, telles que fongicides, antimicrobiens, insecticides ou anti-mollusques [Christoph *et al.*, 2000 ; 2001 ; Reichling *et al.*, 2005 ; van Klink *et al.*, 2005], qui pourraient protéger la plante les produisant contre divers stress biotiques.

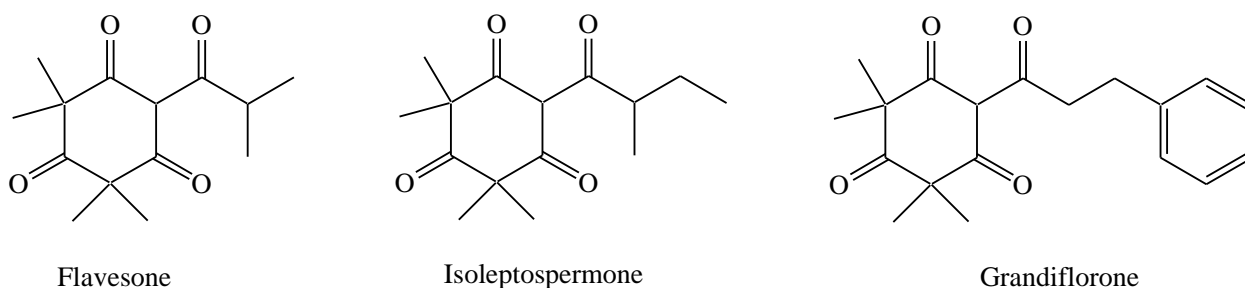


Figure 2 : Structures de tricétones naturelles

De manière concomitante à la découverte de ces phytotoxines naturelles, des études menées chez Zeneca sur la synthèse d'inhibiteurs de la carboxylase acétyl-CoA, dérivés du séthoxydime, ont conduit de manière inattendue à un dérivé tricétonique ayant une activité biologique (Figure 3) [Lee *et al.*, 1998].

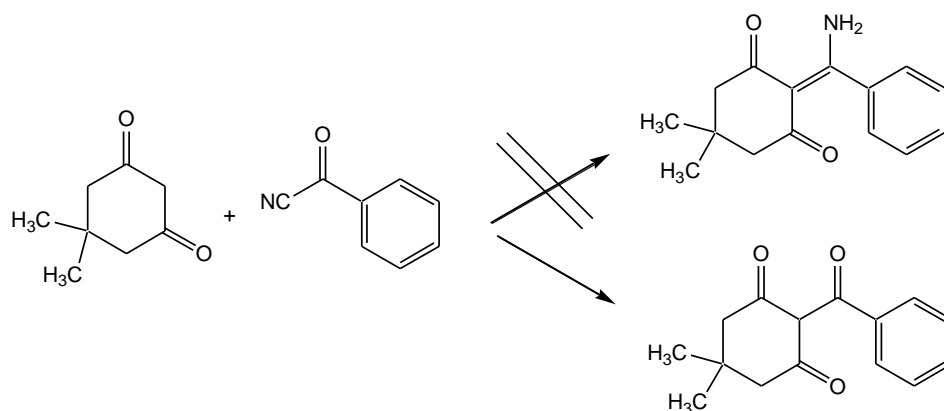


Figure 3 : Structures du séthoxydime attendu et du composé tricétonique obtenu

De nombreux analogues, dérivés de cette structure tricétonique, ont été synthétisés et des études structure-activité, afin d'optimiser l'efficacité des propriétés herbicides, ont mis en évidence [Lee *et al.*, 1998 ; Beaudegnies *et al.*, 2009] :

- l'obligation d'avoir un substituant en position 2 (X) sur la partie benzoyl mais aussi un en position 4 (Y), ces deux groupements devant avoir un fort caractère inductif électro-attracteur (Figure 4) ;
- une corrélation positive entre la constante d'acidité (pKa) et l'activité herbicide ;
- une préférence pour l'absence de substituant sur la partie cyclohexanedione. Il s'agit là d'un compromis, la présence de substituants, en particulier méthyle, améliorant l'activité herbicide mais entraînant une perte de sélectivité vis-à-vis du maïs et/ou une persistance excessive dans les sols [Mitchell *et al.*, 2001].

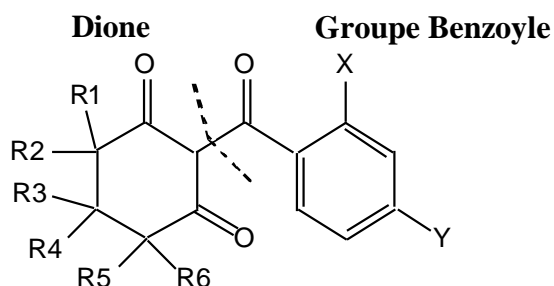


Figure 4 : Structures des composés de la famille des benzoylcyclohexadiones [Mitchell *et al.*, 2001]

Ces travaux de recherche ont conduit à la naissance de la famille des herbicides tricétoniques parmi laquelle quatre molécules actives ont été commercialisées.

La première était la **nitisinone** [2-(2-nitro-4-trifluorométhylbenzoyl)cyclohexane-1,3-dione] [Michaely et Kraatz, 1988] (Figure 5). La surprise est venue du fait que cette molécule s'est révélée être un excellent agent thérapeutique [Lindstedt *et al.*, 1992] pour lutter contre la tyrosinémie I, maladie génétique qui peut conduire à la mort suite à une insuffisance hépatique. Très efficace, le traitement à base de nitisonne (Orfadin®) permet depuis 1992 aux patients de vivre normalement en évitant une transplantation du foie indispensable auparavant [Santra et Baumann, 2008 ; Laroche *et al.*, 2012].

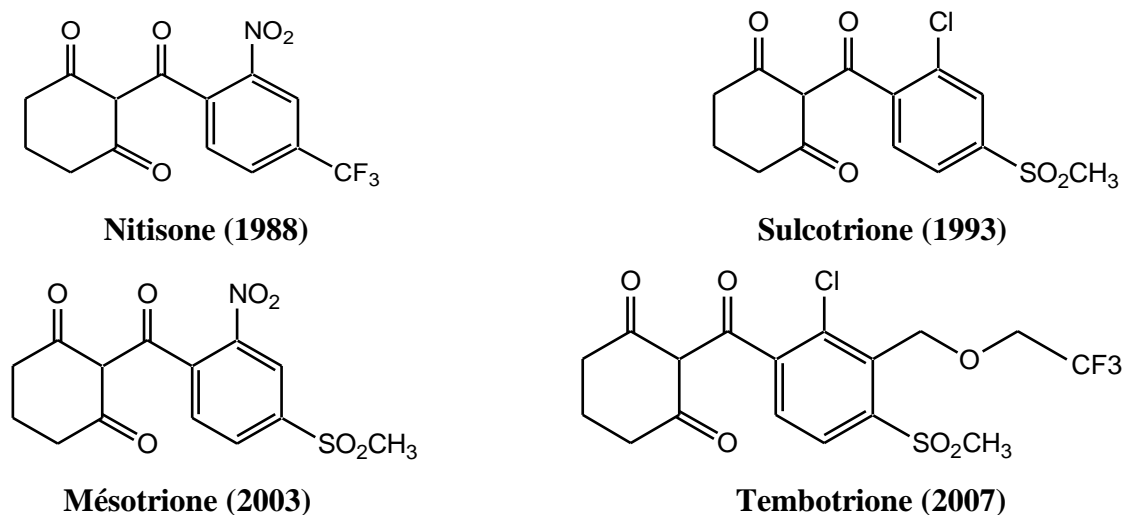


Figure 5 : Structures des herbicides de la famille des tricétones commercialisées

La **sulcotrione** [2-(2-chloro-4-méthylsulfonylbenzoyl)cyclohexane-1,3-dione] est le premier herbicide commercialisé de la famille des tricétones en 1993 par la société Bayer CropScience (Figure 5). Il s'agit d'un herbicide sélectif du maïs pour contrôler notamment les dicotylédones, commercialisé sous les noms de Mikado® et Sulko⁺® [Wilson et Foy,

1990]. Ces suspensions concentrées contenant 300 g/L de sulcotrione, sont généralement utilisées en post-levée des adventices au stade 5-6 feuilles du maïs, mais peuvent être utilisées en pré-émergence ou même en pré-semis. Les doses appliquées varient entre 300 et 450 g /ha. La sulcotrione agit principalement par voie foliaire mais peut également agir par voie racinaire.

En 2003, la **mésotrione** (Figure 5) est mise sur le marché par la firme Zeneca (devenue Syngenta Crop Protection) comme nouvel herbicide pré-et post-émergence pour le contrôle d'un éventail beaucoup plus large d'adventices que la sulcotrione (herbes à feuilles larges et graminées) du maïs avec un taux d'application de 100 à 225 g/ha et de 70 à 150 g/ha, respectivement. Sa triple action racinaire, anti-germinative et surtout foliaire, en fait un herbicide en progression en termes d'utilisation. Rapidement absorbée par les mauvaises herbes après application, cette molécule active est immédiatement métabolisée par le maïs, la rendant inoffensive. Le Callisto® produit formulé commercial, contient 100 g/L de mésotrione [Béraud *et al.*, 2001].

En 2007, la **tembotrione** (Figure 5) prend sa place comme molécule de la famille des tricétones la plus récemment enregistrée et mise sur le marché dans plusieurs pays dont la France. L'introduction d'un substituant -O-CH₂-CF₃ en position 3 de la partie benzoyle de la sulcotrione offre de nouvelles propriétés de solubilité permettant à la fois le passage facile des barrières hydrophiles et lipophiles depuis son dépôt à la surface des feuilles jusqu'aux sites d'action à l'intérieur des cellules végétales (Santel, 2009). Herbicide de post-levée utilisable sur toutes les variétés de maïs, ayant un spectre d'action toujours plus large (van Almsick *et al.*, 2009), elle est commercialisée sous le nom de Laudis® OD par la société Bayer CropScience (44 g/L). La formulation se présente sous forme d'une dispersion d'huile (oil dispersion – OD) dans laquelle elle est associée à un phytoprotecteur, l'éthylisoxadifène (22 g/L), pour garantir une complète innocuité vis-à-vis du maïs.

Toutes ces molécules présentent un caractère d'acide faible (pKa ~ 3) et sont susceptibles d'être trouvées sous différentes formes céto-énoliques suivant les conditions du milieu. Deux conformations sont généralement considérées comme dominantes en solution aqueuse : il s'agit de la forme exocyclique et de la forme endocyclique, cette dernière apparaissant comme la plus stable [Huang *et al.*, 2002 ; Owens *et al.*, 2013] (Figure 6).

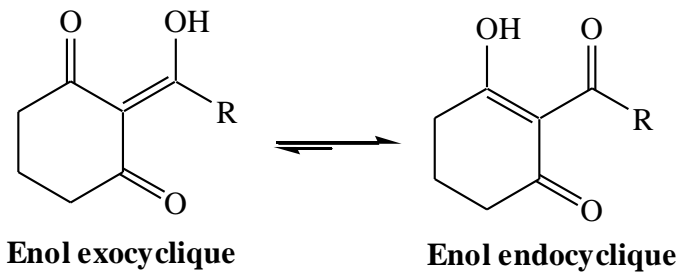


Figure 6 : Formes tautomères dominantes des benzoylcyclohexanediones en solution aqueuse

II. Mode d'action des composés de la famille des cyclohexanediones

L'originalité des composés de la famille des benzoylcyclohexanediones est la cible visée et le mode d'action. Ces composés inhibent de manière compétitive une enzyme, la 4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase ou 4-HPPD, intervenant lors de la seconde étape du catabolisme de la tyrosine. Cette enzyme est commune à la quasi-totalité des organismes aérobies mais elle est également spécifiquement requise pour la biosynthèse des caroténoïdes. La diminution de la concentration en caroténoïdes dans la plante entraîne une destruction rapide de la chlorophylle et un blanchiment visible des végétaux, dus à l'altération de la structure cellulaire par production non contrôlée de radicaux libres, qui précède une nécrose et la mort des plantes sensibles en quelques jours (Figure 7).

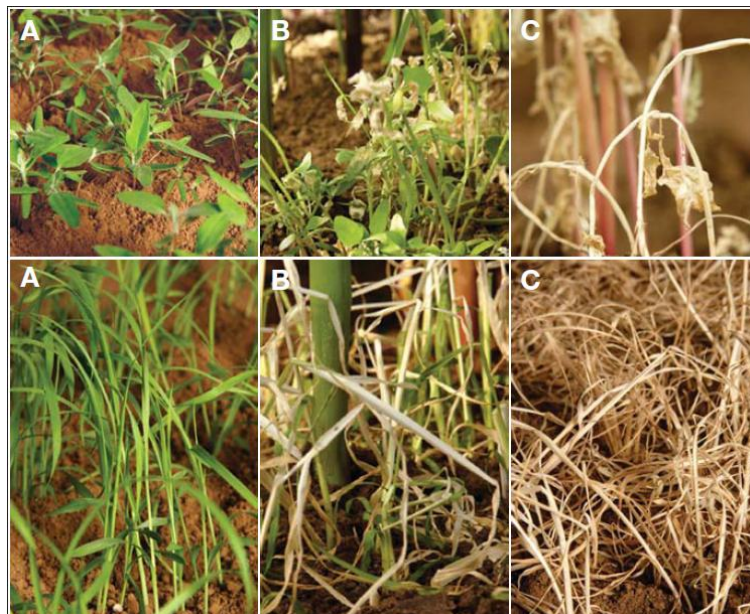


Figure 7 : Développement des symptômes de blanchiment chez *Chenopodium album* (haut) et *Echinochloa crus-galli* (bas) après application de Laudis OD®. A: après pulvérisation ; B: blanchiment des tissus les plus jeunes ; C : Mort de la plante (d'après Santel, 2009)

La 4-HPPD, oxygénase non hémique, fer II dépendante, catalyse la transformation du 4-hydroxyphénylpyruvate en homogentisate (Figure 8). Cette conversion comprend une décarboxylation de la chaîne latérale 2-oxoacide, l'hydroxylation du cycle aromatique et le réarrangement 1,2 du groupe carboxyméthyle lors d'un même cycle catalytique [Moran, 2005].

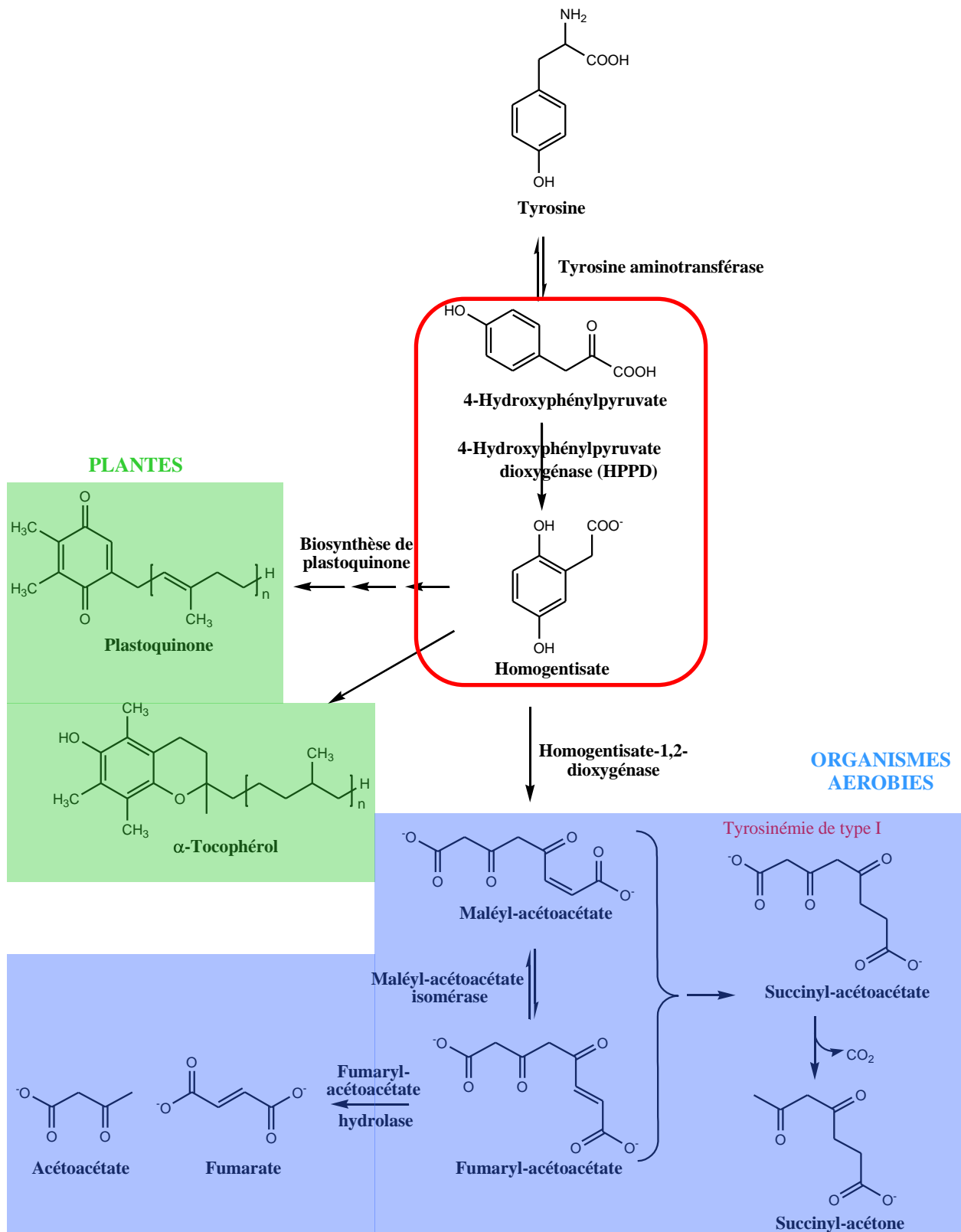


Figure 8 : Catabolisme de la tyrosine chez les plantes et les organismes aérobies

Chez les plantes, l'homogentisate est un précurseur clef dans la synthèse des tocophérols (anti-oxydants neutralisant les composés toxiques formés lors de la

photosynthèse) et des plastoquinones (cofacteurs pour la phytoène réductase, enzyme intervenant lors de la biosynthèse des caroténoïdes). La 4-HPPD inhibée, le taux de plastoquinone diminue, provoquant l'épuisement des caroténoïdes et l'apparition des symptômes de blanchiment [Mayonado *et al.*, 1989]. Chez les mammifères, l'homogentisate intervient dans la dégradation des acides aminés aromatiques, en particulier dans la voie catabolique de la tyrosine.

Cette enzyme constitue donc une cible de choix aussi bien en agriculture qu'en traitement thérapeutique.

III. La mésotrione

III.1. Caractéristiques et utilisations agronomiques

La mésotrione [2-(4-méthylsulfonyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione] (Figure 9) est un acide faible ($pK_a = 3,12$ à 20°C), dont la solubilité dans l'eau passe de $2,2 \text{ g/L}$ à pH 4,8 à 22 g/L à pH 9. Très peu volatile ($K_H = 5,1 \times 10^{-7} \text{ Pa.m}^3/\text{mol}$ à 20°C), elle est stable dans l'eau dans une gamme large de pH et de températures.

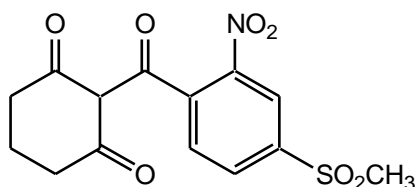


Figure 9 : Structure de la mésotrione

L'application agricole de cet herbicide ne cesse d'augmenter en France depuis sa commercialisation en 2003 pour la protection des cultures de maïs, notamment en remplacement de l'atrazine (Figure 10).

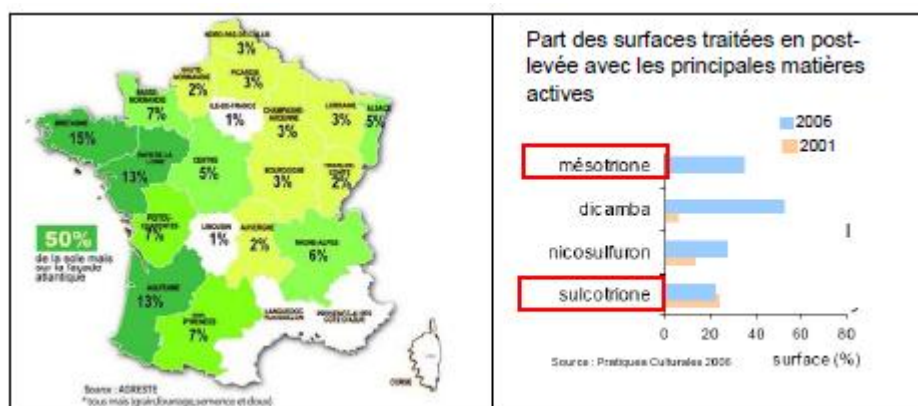


Figure 10 : Culture de maïs en France et principaux herbicides utilisés en post-émergence (Données Agreste Aquitaine, 2008)

Sutton *et al.* (2002) ont montré que certaines espèces adventices appartenant aux genres *Chenopodium*, *Amaranthus*, *Polygonum* ou *Solanum*, présentes dans les cultures de maïs et résistantes aux triazines, sont sensibles à la mésotrione. Trois à cinq jours après son application, les symptômes initiaux de blanchiment deviennent visibles chez les plantes sensibles, et après deux semaines environ, un blanchiment et une nécrose apparaissent sur toute la plante. Le métabolisme de la mésotrione est un des principaux facteurs contribuant à sa sélectivité puisque le maïs n'est pas affecté par ce traitement, sa dégradation métabolique étant très rapide chez cette plante, notamment grâce à des enzymes de la famille des cytochromes P 450 [Béraud *et al.*, 2001 ; Creech *et al.*, 2004].

Il faut noter que les doses requises pour l'élimination des mauvaises herbes en post-levée varient suivant l'espèce à éliminer. Pannacci et Covarelli (2009) ont déterminé la dose minimale qui donne une efficacité satisfaisante en déterminant, par des courbes dose-réponse, les ED 95 (95% de contrôle des mauvaises herbes). Ainsi, une dose d'un sixième de la dose maximale recommandée pour la mésotrione (150 g/ha) suffit pour le contrôle des espèces *Abutilon theophrasti*, *Chenopodium album*, *Solanum nigrum* et *Xanthium strumarium*. Le contrôle des espèces *Amaranthus retroflexus* et *Polygonum persicaria* nécessite 1/4 de la dose maximale. Par contre, *Echinochloa crus-galli* et *Portulaca oleracea* se développent, même pour la dose maximale. La mésotrione, à toutes les doses d'application testées, est sans effet notoire et durable sur le rendement de culture. C'est pourquoi la mésotrione a également été testée en combinaison avec d'autre(s) herbicide(s) ayant des cibles d'action différentes pour élargir le spectre d'action du traitement attendu : on peut citer l'atrazine, inhibiteur du photosystème II [Creech *et al.*, 2004] ; atrazine et S-métolachlore, inhibiteur de la biosynthèse

des acides gras [Vyn *et al.*, 2006] ; nicosulfuron, inhibiteur de l'acétolactate synthase [Skrzypczak *et al.*, 2011] ; prodiamine, inhibiteur de la division cellulaire [McCurdy *et al.*, 2008]...

La mésotrione est donc un herbicide efficace pour contrôler plusieurs espèces de plantes caractérisées par une haute compétitivité avec le maïs, une faible susceptibilité aux herbicides de pré-émergence et qui ont montré des résistances vis-à-vis de nombreuses autres familles d'herbicides. Cependant, des premiers cas de résistance ont été décrits sur un biotype d'amarantes rugueuses (*Amaranthus tuberculatus*) [Hausman *et al.*, 2011], traité en post-levée par des inhibiteurs d'HPPD. Il faut souligner que les amarantes ont des mécanismes d'adaptation particulièrement efficaces puisqu'il s'agit du 5^{ème} mode d'action d'herbicide pour lequel elles développent des résistances.

Les effets potentiels des résidus de la mésotrione à différentes doses, sur la croissance, le rendement ou les défauts de diverses espèces végétales cultivées en rotation avec le maïs ont été étudiés, cette problématique étant cruciale en termes de systèmes de production agricole [Felix *et al.*, 2007 ; Soltani *et al.*, 2007]. Plusieurs critères ont été mis en évidence, le principal étant le taux de résidus en mésotrione qui est lié à la dose appliquée, à la date d'épandage (pré-ou post-levée) mais aussi au type de sol (argileux, taux de matière organique, pH..) et aux précipitations. Les différentes espèces testées ont également des réponses différentes même lorsqu'elles sont cultivées dans les « mêmes » conditions : par exemple, le rendement (T/ha) des haricots verts a diminué de 13% et 31% pour un épandage de mésotrione l'année précédente, à 420 g/ha en pré et post-levée respectivement ; celui de la tomate de 32% et 28% tandis que d'autres espèces ne sont pas ou seulement passagèrement affectées (le chou et les cornichons) [Felix *et al.*, 2007]. De même, des canneberges et des haricots cultivés un an après le maïs présentent une diminution de rendements, notamment dans le cas d'utilisation de la mésotrione en post-émergence. Après un intervalle de deux ans, aucun effet significatif n'a été observé sur ces mêmes cultures [Soltani *et al.*, 2007].

III.2. Métabolisme de la mésotrione chez le rat et la souris

Le métabolisme de la mésotrione chez les rats mâle et femelle et chez la souris a été étudié par Gledhill *et al.* [2001] en vue d'une éventuelle application thérapeutique dans le traitement de la tyrosinémie I. Après administration de la mésotrione radiomarquée à des

doses croissantes (1 à 100 mg/kg) par voies orale et intraveineuse, les auteurs ont observé une rapide absorption, puis excrétion dans l'urine sans transformation d'au moins 95% de la mésotrione chez les deux espèces. L'analyse des urines, fèces et de la bile a permis d'identifier plusieurs métabolites par LC/MS, bien que la mésotrione représente plus de 90% de la radioactivité dans ces fluides (Figure 11). Ces métabolites sont communs chez le rat et la souris et ne sont pas dépendants des doses utilisées. Les principaux métabolites résultent de l'hydroxylation en positions 4 ou 5 de la partie cyclohexanedione de la mésotrione ou de la rupture oxydative entre les deux cycles (MNBA et AMBA). Le pourcentage de ces différents métabolites varie en fonction du fluide étudié.

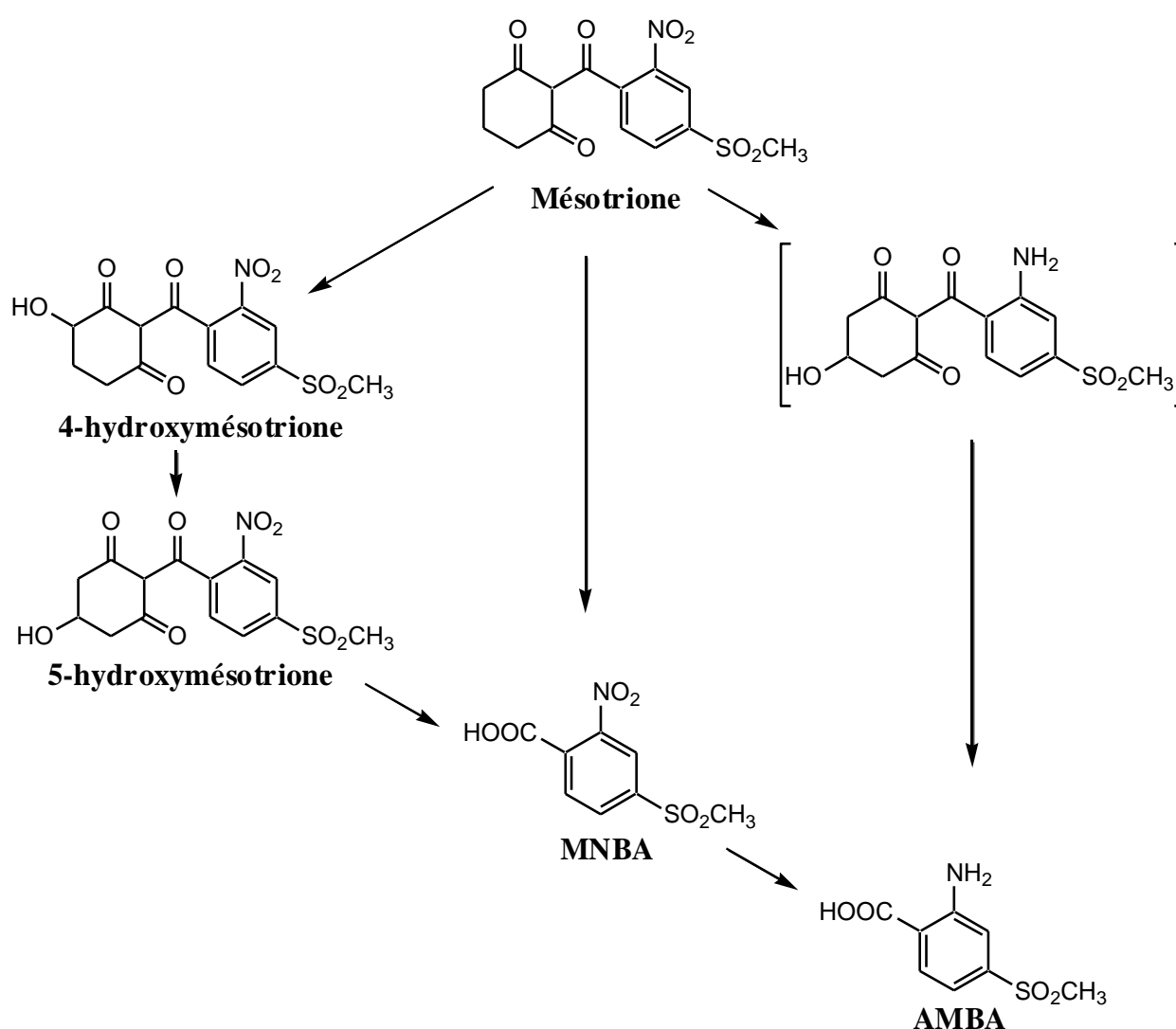


Figure 11 : Schéma métabolique de la mésotrione proposé chez le rat et la souris (d'après Gledhill *et al.*, 2001)

La mésotrione a été testée en tant que traitement potentiel de la tyrosinémie I et ses effets pharmacocinétiques ont été comparés à ceux de la nitisone (NTBC) chez des adultes volontaires sains et en administration orale [Hall *et al.*, 2001]. Si la mésotrione s'avère être un bon inhibiteur de la HPPD, rapidement absorbée et bien tolérée, son effet, très atténué par rapport à celui de la NTBC, et son temps de demi-vie très court dans le plasma (1 h contre 54 h pour la NTBC) ne peuvent pas en faire un traitement de choix. Par contre, l'augmentation du taux de tyrosine et la durée de celle-ci suite à l'absorption « accidentelle » de mésotrione n'est pas suffisante pour causer des effets néfastes [Lewis et Botham, 2013].

III.3. Devenir de la mésotrione dans l'environnement

Après épandage, les pesticides subissent deux grands types de processus : le transport/transfert entre les trois compartiments de l'environnement (l'air, l'eau et le sol) et les transformations. Le transport des pesticides dépend de leurs caractéristiques : la volatilisation dans l'air, la solubilité dans l'eau, les processus d'adsorption-désorption dans le sol contrôlant leur infiltration jusqu'aux nappes phréatiques. Les processus de transformation comprennent : 1- les réactions déclenchées par la lumière solaire (photodégradation) et 2- l'absorption et la métabolisation par les organismes vivants, principalement les microorganismes (biodégradation).

Processus de rétention dans les sols

Le temps de demi-vie de la mésotrione dans les sols est variable selon le type et les propriétés physico-chimiques des sols étudiés: de 2 à 8 jours [Béraud *et al.*, 2001; Otto *et al.*, 2012 ; Sun *et al.*, 2013], de 5 à 32 jours [Dyson *et al.*, 2002 ; Chaabane *et al.*, 2008] ou même de 34 à 50 jours [Rouchaud *et al.*, 2000]. Des essais en plein champ ont montré qu'elle n'est plus retrouvée au-delà de 10 cm [Béraud *et al.*, 2001] et ce dans des temps relativement courts [Barchanska *et al.*, 2012].

Des mesures de coefficients d'adsorption (K_d), réalisées sur plusieurs sols européens et américains ayant des pH très différents (4,4 à 8,1) et des teneurs en matière organique (0,6 à 3,35%) et en argiles (6 à 39%) très variables ont donné des valeurs relativement faibles allant de 0,13 à 5,0 L.kg⁻¹, indiquant une faible rétention de cet herbicide dans les sols [Dyson *et al.*, 2002 ; Chaabane *et al.*, 2008]. Des K_d plus élevés, allant jusqu'à 12,5 L.kg⁻¹, ont été

reportés dans des sols brésiliens très fortement argileux (56 à 65%) [Martinazzo *et al.*, 2011]. Par contre, les paramètres clefs jouant sur les processus d'adsorption de la mésotrione dans les sols, même si ils restent les mêmes, sont plus ou moins considérés comme majeurs ou mineurs suivant les études. Ainsi Dyson *et al.* [2002] mettent en avant le pH et la teneur en carbone organique. En effet, une forte diminution de l'adsorption de la mésotrione est observée avec l'augmentation du pH du sol, la forme dissociée étant moins adsorbée. Pour Chaabane *et al.* [2008] et Martinazzo *et al.* [2011], le paramètre majeur est le pourcentage de fraction argileuse, la teneur et la composition en matière organique (adsorption favorisée par un fort pourcentage en fonctions carboxyliques de la MO) n'étant qu'un facteur secondaire.

Transformation par voie photochimique

La lumière solaire peut agir directement sur les contaminants organiques (photolyse directe) ou indirectement en générant des espèces radicalaires réactives à partir de composés photoréactifs du milieu (matière organique dissoute, nitrates..).

La mésotrione est relativement peu réactive vis-à-vis de la photolyse directe. Ainsi il a été montré que sous irradiation à $\lambda = 365$ nm (correspondant à 94% de l'énergie rayonnante), une solution de mésotrione 0,1 mM pH = 6,5 était très lentement photolysée (moins de 10% après 30 jours) et conduisait à la formation de 3 photoproduits principaux, qui ont pu être identifiés par HPLC-ESI-MS [Ter Halle et Richard, 2006] (Figure 12). Ils correspondent au produit de photohydrolyse (MNBA = Acide 4-méthylsulfonyl-2-nitrobenzoïque), à celui d'hydrophotolyse (P2) et à un β -cétoacide (P3).

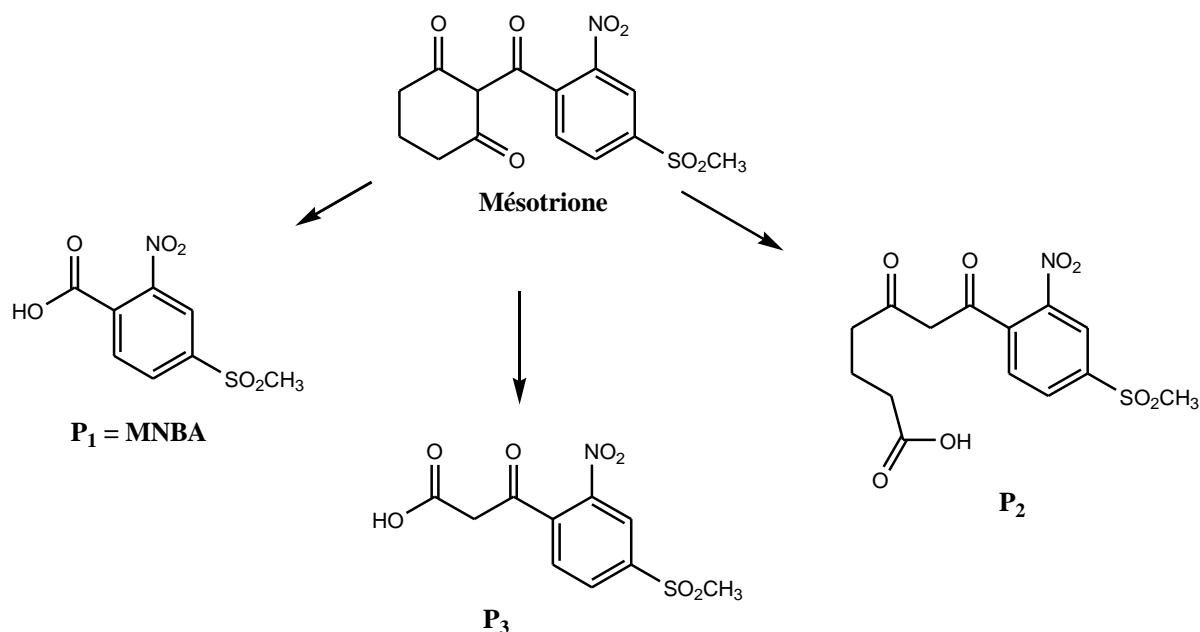


Figure 12 : Photoproduits de la mésotrione obtenus par photolyse directe (d'après Ter Halle et Richard, 2006)

D'autres études réalisées sous irradiation de haute énergie avec des lampes UV-B ($\lambda_{\text{max}} = 313 \text{ nm}$) ont également montré une photolyse très lente de la mésotrione avec un temps de demie-vie de 165h dans l'eau Milli-Q® [Chaabane *et al.*, 2007].

La photolyse indirecte de la mésotrione a également été testée en présence de matière organique naturelle dissoute ou d'ions nitrates dans des conditions proches de celles de l'environnement aquatique [Ter Halle et Richard, 2006]. La vitesse de phototransformation de la mésotrione est multipliée par 10 en présence de 30 mg/L de matière organique. Cependant, l'ajout d'une concentration faible (5 mg/L) l'inhibe de manière surprenante. Les mêmes observations sont faites en présence d'ions nitrates, ceux-ci n'ayant qu'un rôle négligeable lorsqu'ils sont en présence de matière organique dissoute car piégés par celle-ci.

Les plantes, et surtout les feuilles, sont un autre siège de photodégradation des herbicides. L'irradiation de la mésotrione sur des films de cire cuticulaire reconstituée (cire qui recouvre les feuilles des plantes) a montré que sa transformation photolytique est beaucoup plus rapide que dans l'eau, et que l'utilisation de la formulation multiplie encore par 15 la vitesse de photodégradation (temps de demie-vie = 2,2h) par rapport à la molécule pure (temps de demie-vie = 14,5h) [Lavieille *et al.*, 2008 ; Ter Halle *et al.*, 2010]. Cet effet accélérateur est essentiellement dû aux surfactants, qui n'ont pas une activité photochimique mais une action physique en modifiant la distribution de la mésotrione à la surface de la

feuille [Lavieille *et al.*, 2009]. Sur ces films de cire, quatre photoproduits ont été identifiés par HPLC-ESI-MS à partir de la molécule pure (Figure 13). **P1** et **P2**, issus de la photohydrolyse, sont identiques à ceux observés en solution aqueuse. **P4** est issu d'une réaction de photocyclisation conduisant à un dérivé du xanthène. **P3**, lui, est formé par photoréduction du groupement $-\text{NO}_2$ en hydroxylamine, suivie d'une cyclisation intramoléculaire et d'une déshydratation.

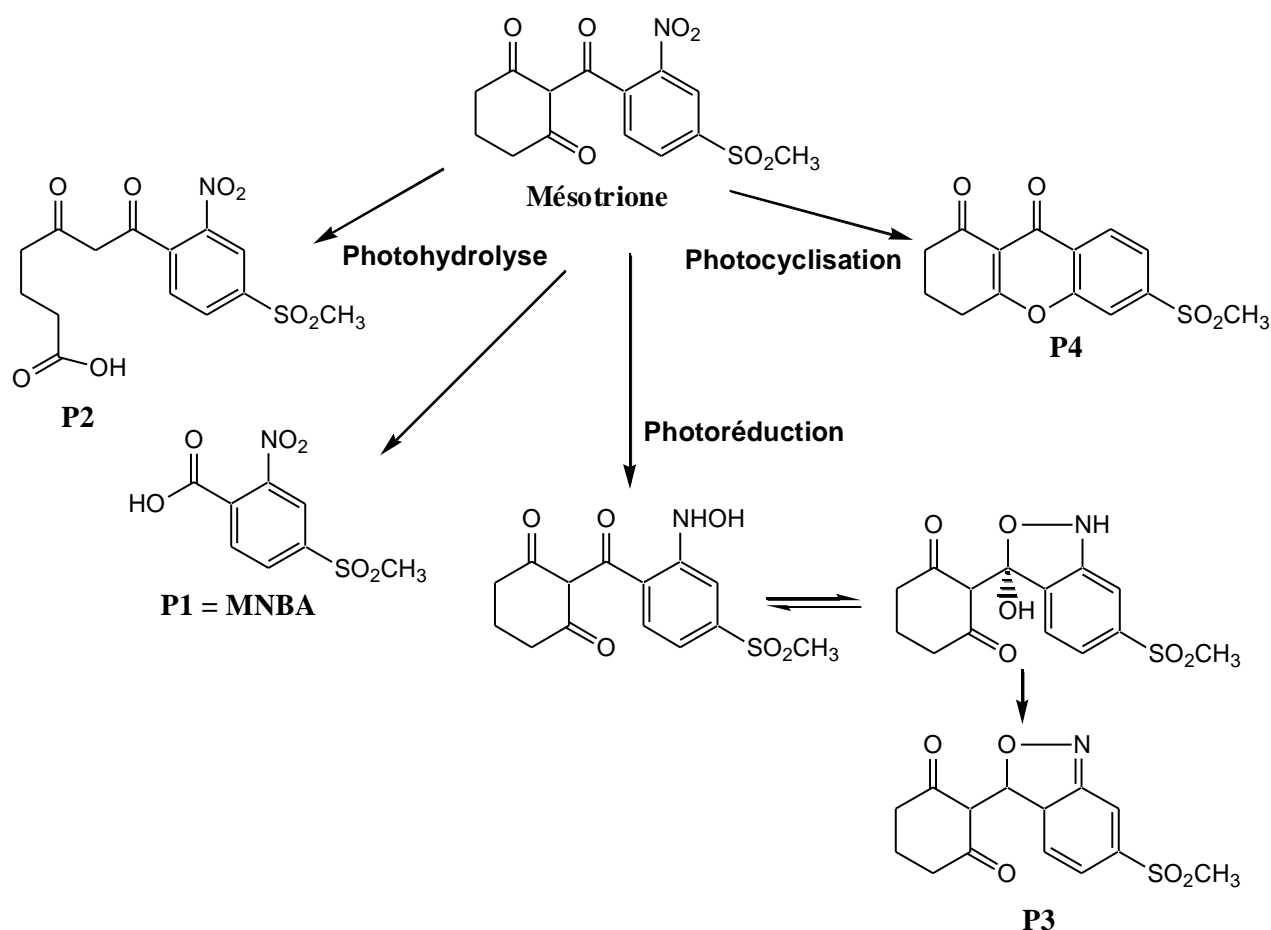


Figure 13 : Structures proposées pour les photoproduits de la mésotrione après irradiation sur de la cire cuticulaire reconstituée (d'après Ter Halle *et al.*, 2010)

Des travaux plus récents ont porté sur la mise au point de traitements des eaux en vue de l'élimination complète de la mésotrione [Bensalah *et al.*, 2011 ; Murati *et al.*, 2012]. Les procédés d'oxydation avancée (AOPs), et notamment de Fenton ou d'électro-Fenton, ont été testés conduisant à une élimination quasi-complète de la mésotrione en des temps variables suivant les concentrations en H_2O_2 et Fe^{2+} . On peut ainsi citer une disparition totale de la mésotrione 0,2 mM (pH = 3,5) en 15 minutes et une minéralisation complète en 90 minutes pour des concentrations en H_2O_2 de 16 mM et en Fe^{2+} de 1 mM [Bensalah *et al.*, 2011]. Un

mécanisme de dégradation a été proposé par analyse HPLC de prélèvements réalisés au cours de la réaction. Le processus de minéralisation commencerait par l'attaque des radicaux hydroxyles sur un des groupements carbonyles conduisant au clivage des deux cycles (1,3-cyclohexanedione et MNBA), suivie de l'ouverture oxydative des cycles et/ou de la libération de groupements nitro et/ou sulfonyle conduisant à la formation d'acides carboxyliques simples (oxalique, pyruvique...). Ces acides seraient finalement transformés en dioxyde de carbone et en ions inorganiques.

Transformation par voie biologique

Si le sol constitue le réceptacle primaire des pesticides après leur épandage, ils sont également très souvent retrouvés dans les zones aquatiques connexes. Quel que soit le compartiment, un des processus dominants régissant leur devenir est l'action des organismes vivants, notamment des microorganismes.

Les métabolites issus de la biodégradation de la mésotrione dans le sol, généralement décrits dans la littérature et recherchés lors des analyses d'eaux, de sols ou de céréales, sont l'acide 4-méthylsulfonyl-2-nitrobenzoïque (MNBA) et l'acide 2-amino-4-méthylsulfonylbenzoïque (AMBA) (Figure 14) [Alferness et Wiebe, 2002].

Des études plus poussées visant à mettre en place un schéma détaillé des voies métaboliques impliquées lors de la biodégradation de la mésotrione ont été réalisées, notamment dans notre laboratoire. Après un large criblage de notre souchothèque, Durand *et al.* (2006a) ont isolé et caractérisé la première souche dégradant la mésotrione : *Bacillus* sp. 3B6. Cette bactérie est capable de biotransformer complètement la mésotrione, même à de très fortes concentrations (jusqu'à 5 mM), en conduisant à l'accumulation d'acide 2-amino-4-méthylsulfonylbenzoïque (AMBA). Des analyses systématiques par RMN (*in situ* ^1H , RMN 2D) mais aussi par LC-ESI-MS ont permis de mettre en évidence deux voies métaboliques de biodégradation (Figure 14) [Durand *et al.*, 2006b ; 2010]:

- une voie majoritaire correspondant à la réduction de la fonction nitro de la mésotrione en hydroxylamine **M2**. Ce métabolite est en équilibre avec le métabolite **M3** formé par cyclisation intramoléculaire suite à une addition nucléophile de la fonction -OH de l'hydroxylamine sur le groupement carbonyle exocyclique. **M2** et **M3**, relativement instables

notamment en conditions aérobies, sont dégradés en AMBA (voie favorisée). **M3** peut aussi se transformer en **M4** (isoxazole) par perte d'une molécule d'eau.

- la deuxième voie, minoritaire, conduit au MNBA après rupture oxydative entre les deux cycles et réduction rapide du groupement nitro.

La formation d'acide glutarique a également été observée. Composé facilement assimilable par la bactérie, il provient sans doute de la rupture oxydative de la partie cyclohexanedione libérée lors de la coupure entre les deux cycles.

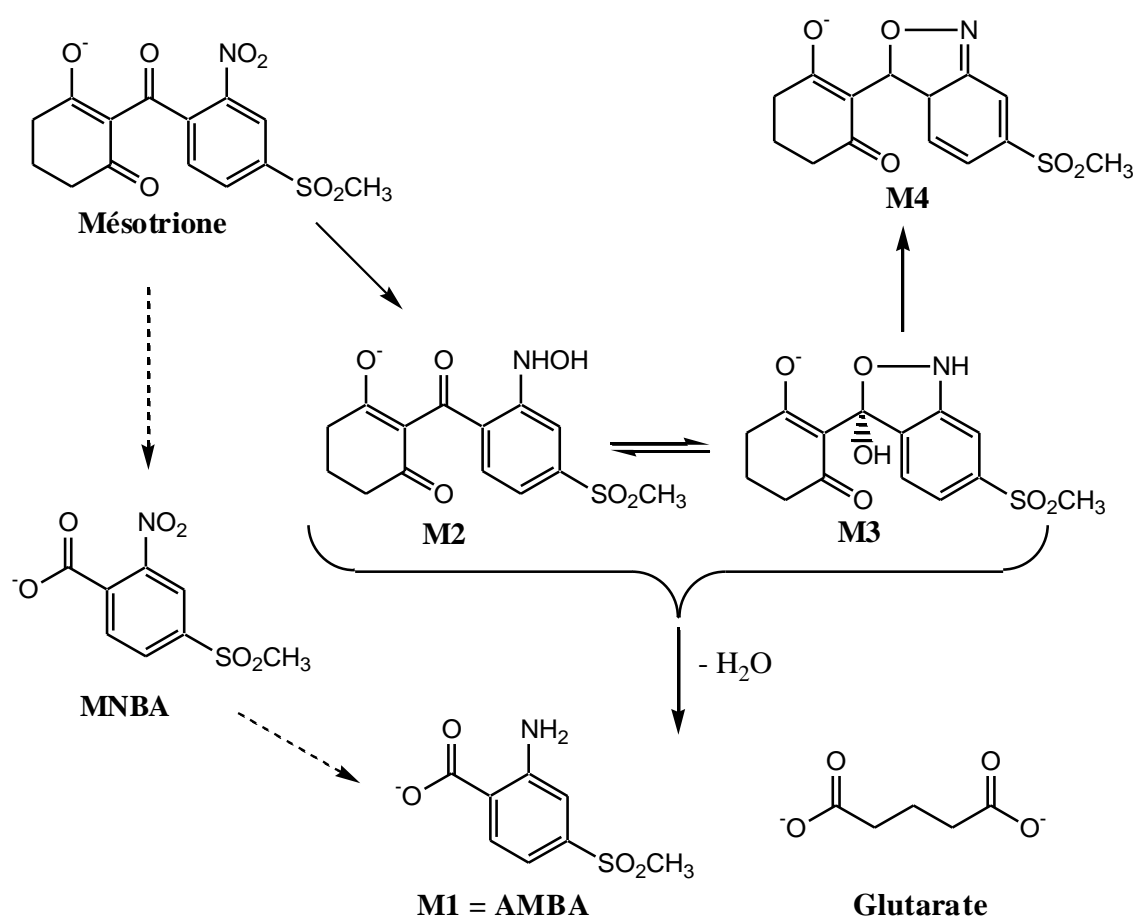


Figure 14 : Schéma métabolique de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6. (d'après Durand *et al.*, 2010)

Batissou *et al.* (2009) ont plus récemment isolé, des bactéries dégradantes à partir d'un sol noir de Limagne (Puy de Dôme, France), vierge de toute contamination par la mésotrione, par technique d'enrichissement. Des analyses par technique de fingerprint TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis) ont mis en évidence un impact de la mésotrione sur la structure de la diversité microbienne uniquement à forte dose (100 mg/L). Deux isolats

bactériens, correspondant à des souches adaptées à la mésotrione, ont été caractérisés : une souche d'*Arthrobacter* sp. non-dégradante et une souche de *Bacillus* sp. Mes11(= IB11), capable elle, de biodégrader complètement et rapidement la mésotrione. La voie de biodégradation semble très similaire à celle observée avec *Bacillus* sp. 3B6 et 3 métabolites communs ont pu être identifiés (**M1** = AMBA, **M2** et **M3**) (Figure 15). L'AMBA est là encore le métabolite terminal, qui s'accumule dans le milieu. Un métabolite supplémentaire transitoire, différent de **M4**, a été observé par RMN ^1H et LC-MS.

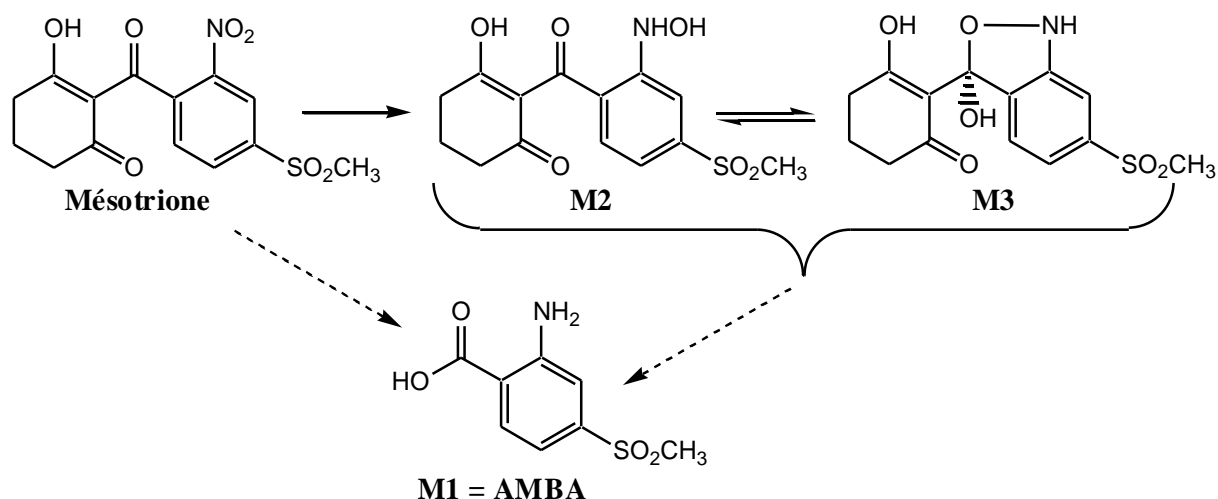


Figure 15 : Schéma métabolique de la mésotrione par *Bacillus* sp. Mes11 (d'après Batisson *et al.*, 2009)

Une autre souche dégradant la mésotrione, *Pantoea ananatis*, a été isolée d'un lac du Brésil entouré de champs de maïs traités avec cet herbicide [Pileggi *et al.*, 2012]. Seule souche dégradante parmi les 359 souches isolées, cette bactérie à Gram négatif n'utilise pas la mésotrione comme source de carbone mais la dégrade en donnant trois métabolites identifiés par LC-(-)ESI-MS/MS (Figure 16). Aucune trace de MNBA et AMBA n'a été détectée.

On peut cependant se poser des questions sur la stabilité de ces métabolites peroxydés et plus généralement sur leur identification.

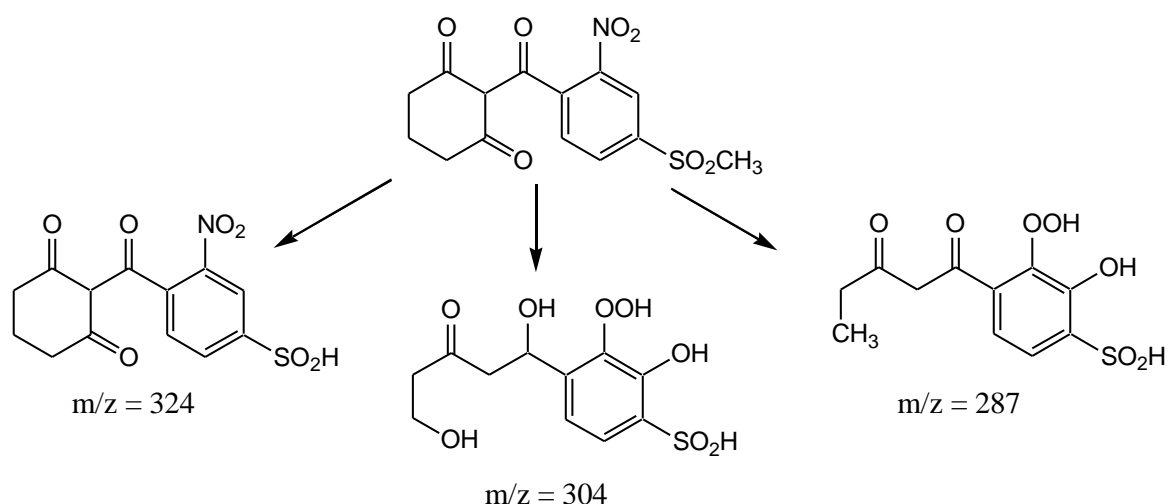


Figure 16 : Schéma métabolique de la mésotrione par *Pantoae ananatis* (d'après Pileggi *et al.*, 2012)

III.4. Impact de la mésotrione - Toxicité

L'utilisation intensive d'herbicides dans l'agriculture est accompagnée d'un risque potentiel de contamination, notamment des écosystèmes aquatiques, qu'il faut évaluer. L'impact de la mésotrione, molécule pure ou formulée, a été testé sur plusieurs organismes cibles ou non cibles par différentes approches.

Sur sa fiche sécurité, la mésotrione est classée dans les composés dangereux pour l'environnement aquatique en termes de toxicité aiguë (catégorie 1) et chronique (catégories 1 et 2). Par exemple, sa LC_{50} a été évaluée à 532 mg.L^{-1} chez un poisson-chat d'Amérique du Sud (*Rhamdia quelen*) [Kreutz *et al.*, 2008]. Chez le rat, la DL_{50} par voie orale a été déterminée à 5 g.kg^{-1} [Béraud *et al.*, 2001], son IC_{50} à 13,1 et $56,1 \text{ mg.L}^{-1}$ pour les microalgues *Amphora coffeaformis* et *Ankistrodesmus fusiformis*, respectivement [Valiente Moro *et al.*, 2012]. Une étude, incluant la mésotrione formulée, a été réalisée par Bonnet *et al.* (2008) sur des microorganismes modèles eucaryote (*Tetrahymena pyriformis*) et procaryote (bactérie marine luminescente : *Vibrio fischeri* = test standardisé Microtox®). Aucun effet toxique de la molécule pure n'a été observé sur la croissance de *T. pyriformis* contrairement aux résultats obtenus sur le métabolisme de *V. fischeri* ($IC_{50} = 43,6 \text{ mg.L}^{-1}$). Des effets beaucoup plus importants sont observés avec la formulation, Callisto®, avec des IC_{50} de 4,0 et $1,1 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivement. Dans toutes ces études, la mésotrione pure présente une toxicité aiguë modérée.

D'autres travaux ont tenté de mettre en évidence de potentiels impacts de cet herbicide en utilisant différentes stratégies. Une approche par métabolomique (empreintes RMN ^1H) réalisée sur la petite lentille d'eau (*Lemna minor*) a montré, par comparaison d'extraits bruts de plantes traitées et non traitées par la mésotrione suivies d'analyses multivariées des résultats par PLS, des différences dans la formation de composés possédant des groupements méthyle, méthylène, hydroxyle, amine et thiol, et donc un véritable impact sur le métabolome de cette plante. Par contre, aucun symptôme physiologique visible n'a été observé [Aliferis *et al.*, 2009].

Des études dose-réponse des communautés microbiennes du sol [Crouzet *et al.*, 2010], ou plus spécifiquement des communautés de cyanobactéries [Crouzet *et al.*, 2013], réalisées dans des microcosmes contaminés avec de la mésotrione, pure ou formulée, à 1, 10 ou 100 fois la dose agronomique, montrent que ces communautés sont peu sensibles à la mésotrione à la dose agronomique, quelle que soit sa forme. A 10 fois la dose, seul le Callisto® induit une diminution significative de la biomasse photosynthétique. A 100 fois la dose, la molécule, pure ou formulée, présente des impacts négatifs sur toutes ces communautés, aussi bien en termes de structure que de diversité, la communauté photosynthétique se montrant plus sensible que la communauté totale bactérienne et fongique.

Le comportement d'autres organismes photosynthétiques, des microalgues, a été également suivi en présence de mésotrione : si les effets sont différents suivant les souches, une stimulation de la croissance a été observée plus ou moins rapidement dans tous les cas, indiquant une capacité des cellules algales à s'adapter et à compenser les effets inhibiteurs [Valiente Moro *et al.*, 2012].

La mésotrione peut être considérée comme un herbicide ayant un faible potentiel de contamination des eaux souterraines. Certes, elle présente une relative mobilité dans les sols mais a un temps de demi-vie relativement court. Par contre, elle peut être lessivée et transformée en produits de dégradation potentiellement plus toxiques ou plus persistants dans l'environnement. Il faut également noter que la formulation apparaît plus toxique que la molécule pure.

La famille des triazoles : cas du tébuconazole

I. La famille des triazoles

La première mention d'activité pesticide pour une molécule possédant un cycle 1,2,4-triazole date des années 1945 [D'Alelio, 1945]. Le 3-amino-1,2,4-triazole (Figure 17), commercialisé ultérieurement sous le nom d'Amizol puis Amitrole, a été utilisé comme défoliant, en particulier dans les champs de coton. Son effet toxique était lié à la destruction de la chlorophylle présente, à une inhibition de sa biosynthèse, ainsi qu'à des interférences avec le métabolisme des carbohydrates [Linser et Kiermayer, 1957]. Il reste utilisé à l'heure actuelle comme désherbant total sur des zones de production non destinées à la consommation, étant fortement soupçonné d'être cancérigène. Au cours de ces mêmes années (1955-1960), plusieurs dérivés triazole ont montré des activités biologiques comme inhibiteurs de la cholinestérase, stimulants du système nerveux central ou perturbateurs de la mitose [Potts, 1961].

Depuis le lancement du premier fongicide, le triadimefon (Figure 17) en 1977 par la société Bayer, près de 40 dérivés triazoliques ont été commercialisés par les compagnies agrochimiques, parmi lesquels le tébuconazole, l'époxiconazole et le difénoconazole (Figure 17) sont les plus utilisés. Aujourd'hui, les fongicides de la famille des triazoles représentent les meilleures ventes de fongicides en raison de leur très large spectre d'action et de leur mode unique d'action, qui permet le traitement et la protection d'une grande variété de cultures (céréales, soja, vignes, fruits, légumes et fleurs ornementales). Ils sont très efficaces contre de nombreuses maladies fongiques, y compris l'oïdium [Pearson *et al.*, 1994] et les rouilles [Roberts *et al.*, 1999] réputées comme résistantes à de nombreux fongicides. Ces molécules sont en majorité systémiques (xylémiennes). Deux d'entre elles sont toutefois des fongicides de contact : le bitertanol et le difénoconazole (Figure 17).

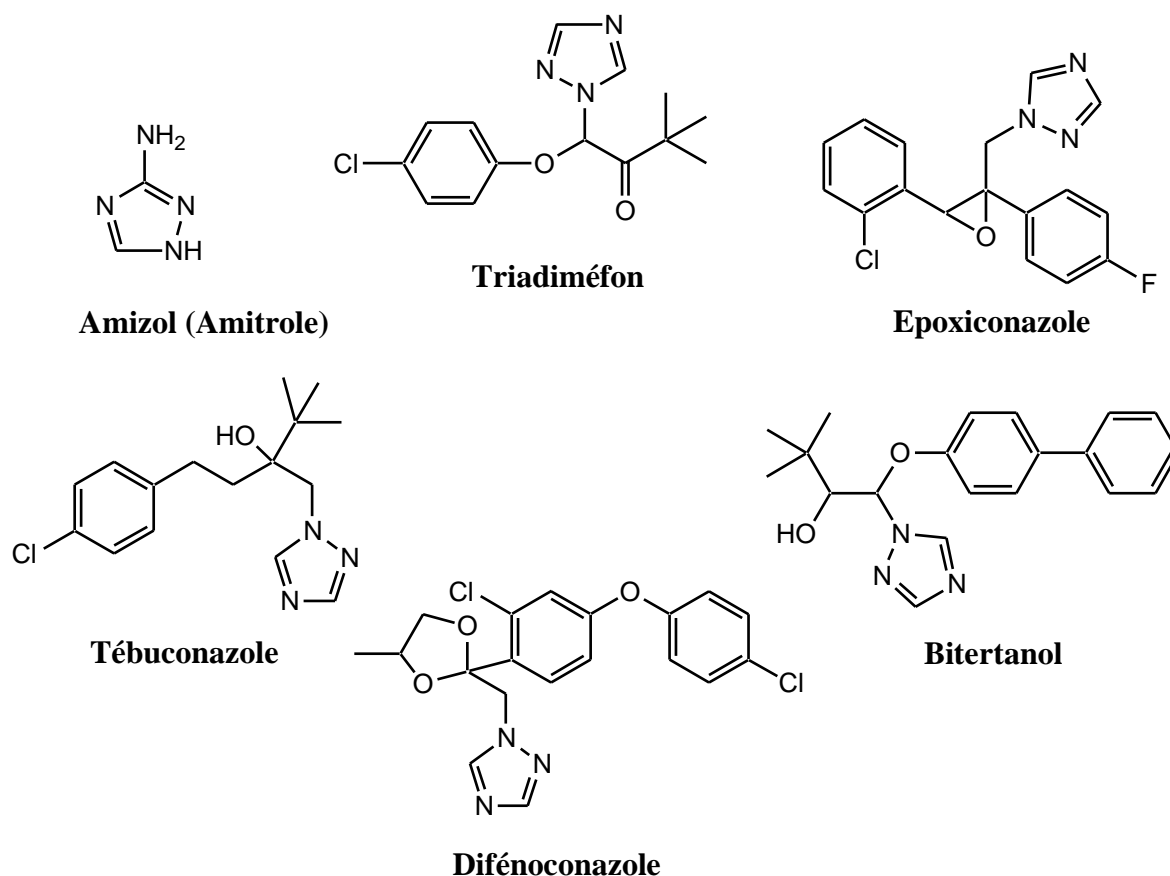


Figure 17 : Structures de dérivés triazoliques utilisés en agriculture comme fongicides

Les composés de la famille des triazoles sont également très utilisés dans d'autres domaines d'application :

- en tant que biocides dans certains produits polymères utilisés en extérieur pour les protéger des dégradations microbiennes ;
- dans le traitement du bois, qu'il s'agisse de sa protection en tant que bois brut immédiatement après la coupe ou de produits finis (portes et fenêtres). Le produit commercialisé Woodlife[®] 111 (Kop-coat, Inc.) contient par exemple du tébuconazole, du propiconazole et un autre type de fongicide de la famille des butylcarbamates [Stavova *et al.*, 2011]. De même au Japon, le cyproconazole et le tébuconazole sont utilisés en mélange pour garantir la qualité du bois des habitations [Japan Housing and Wood Technology Center (HOWTEC), 2002].
- en médecine humaine et vétérinaire en tant que fongicides à large spectre contre les mycoses superficielles et profondes, en particulier dans le traitement des candidoses orales,

vaginales ou systémiques ainsi que pour les méningites coccidioidale ou cryptococcale [Menegola *et al.*, 2006]. Par exemple, le fluconazole (**Triflucan®**) et l'itraconazole (**Sporanox®**) sont particulièrement utilisés dans ces infections (Figure 18). Certains sont même prescrits en thérapie cancéreuse comme anti-œstrogènes non-stéroïdiens dans certains cas de cancer du sein [Zarn *et al.*, 2003]. D'autres pathologies sont également traitées avec ces composés : le fluconazole est très efficace contre les infections des voies urinaires causées par diverses souches de *Candida* [Saag and Sismukes, 1988] ; le voriconazole (**VFEND®**) (Figure 18) est commercialisé contre les infections nosocomiales communes telles que l'aspergillose invasive et la candidose [Walsh *et al.*, 2008]. A l'heure actuelle, une vingtaine de molécules de cette famille sont sur le marché.

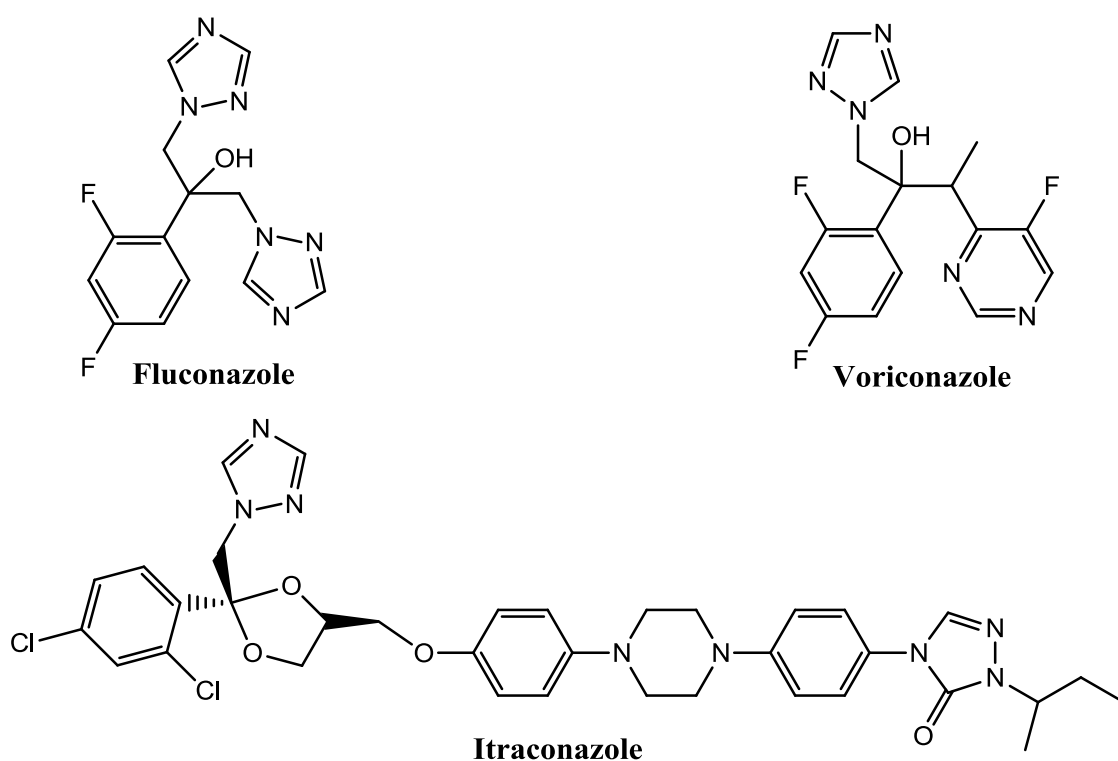


Figure 18 : Structures de dérivés triazoliques utilisés en médecine

La plupart de ces fongicides possède un ou deux centres chiraux dans leur structure moléculaire (Figure 19). En conséquence, ils peuvent être présents sous forme de deux énantiomères ou quatre diastéréoisomères possédant généralement des activités biologiques et/ou des toxicités différentes, les interactions avec le récepteur du système biologique étant souvent stéréospécifique [Burden *et al.*, 1987 ; Mazur *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2007]. Les

fongicides utilisés actuellement sont commercialisés sous forme d'un mélange d'énantiomères.

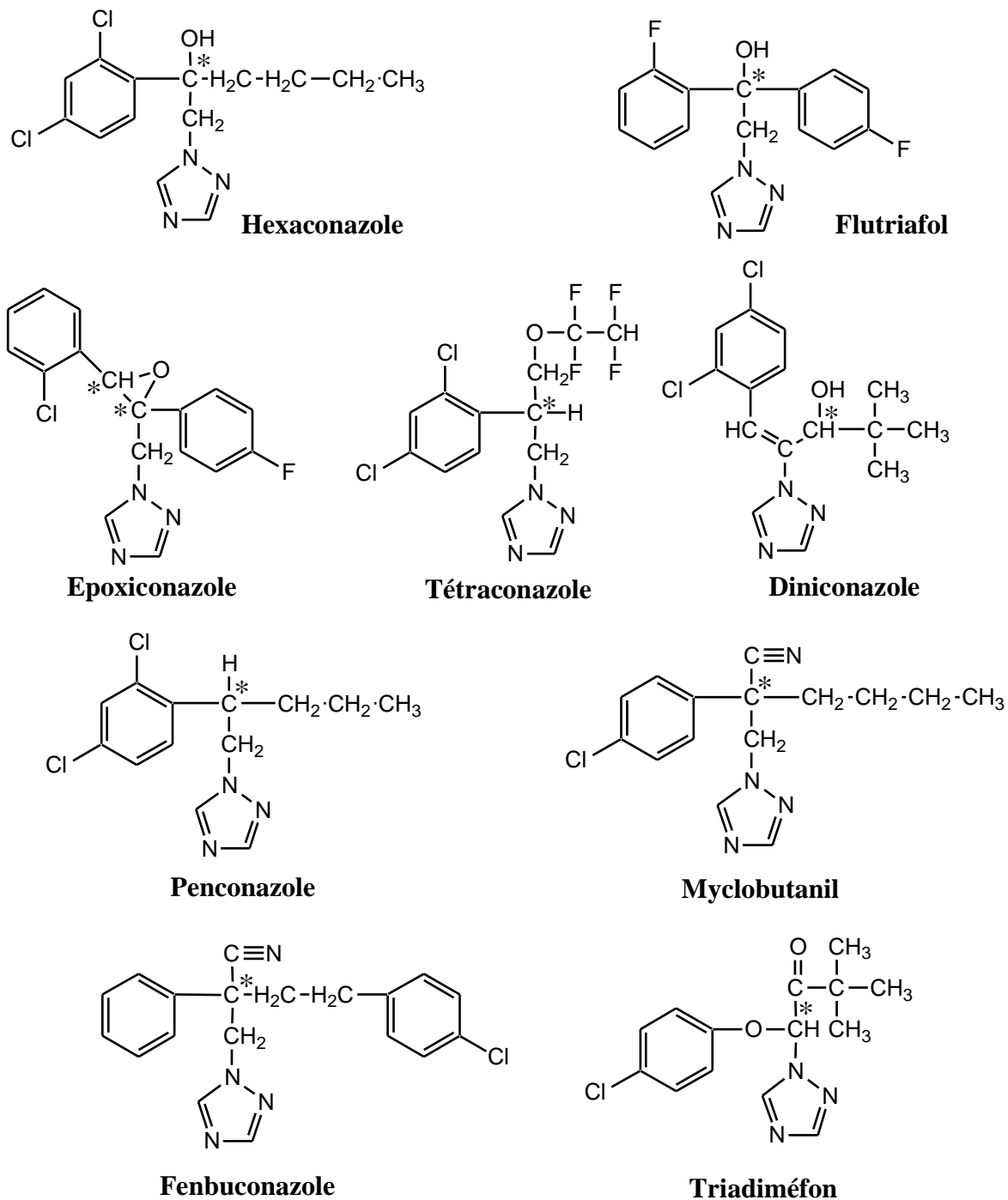


Figure 19 : Exemples de structures de triazoles chiraux

En raison d'un très large spectre d'action dû à leur mode d'action et d'un risque de résistance relativement faible par rapport aux autres fongicides tels que les benzimidazoles et

les dicarboximides, les triazoles sont actuellement la plus importante famille de fongicides sur le marché.

II. Mode d'action des composés de la famille des triazoles

L'activité fongicide des triazoles est basée sur leur capacité à inhiber la biosynthèse de l'ergostérol, un stérol membranaire essentiel des souches fongiques, en se liant à l'hème du cytochrome P450 (CYP51 = lanostérol 14 α -diméthylase) impliqué dans la transformation du lanostérol en ergostérol (Figure 20) [Roberts et Hutson, 1999 ; Onyewu *et al.*, 2003]. Cette inhibition conduit à une accumulation de stérols non déméthylés, modifiant la forme et les propriétés physiques de la membrane fongique (diminution de la fluidité) et entraînant notamment un changement de la perméabilité et le mauvais fonctionnement des protéines membranaires.

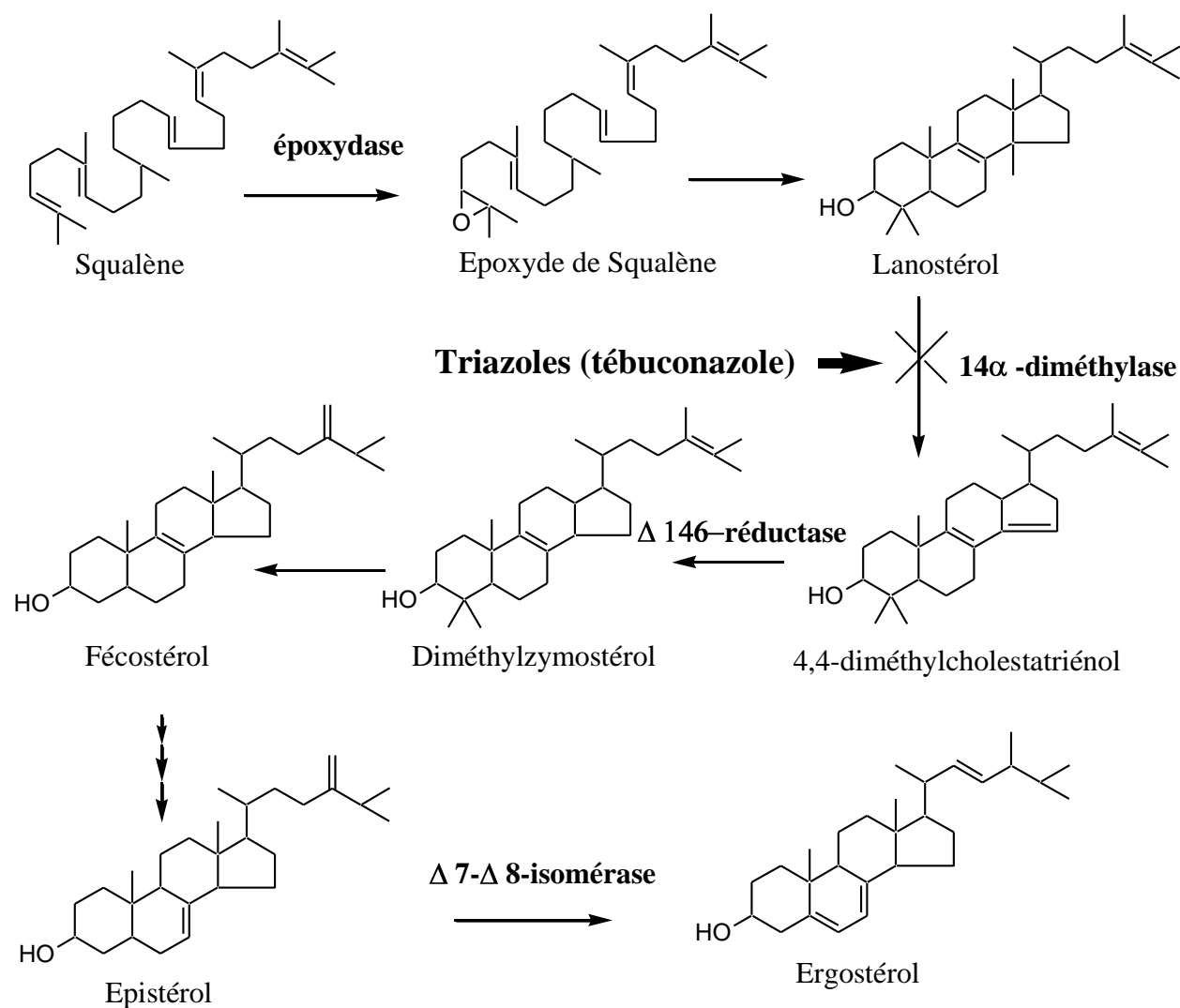


Figure 20 : Schéma de biosynthèse de l'ergostérol et site d'action des triazoles

Le pouvoir inhibiteur de ces composés n'est pas restreint aux champignons et ils agissent également sur un certain nombre de cytochromes P450 de mammifères, contrôlant la biosynthèse stéroïdienne et le métabolisme microsomal du foie [Loose *et al.*, 1983 ; Sheets et Mason, 1984]. C'est pourquoi certains sont également utilisés en tant qu'anti-œstrogènes non-stéroïdiens dans certains cas de cancer du sein [Zarn *et al.*, 2003].

III. Le tébuconazole

III.1. Caractéristiques et utilisations agronomiques

Le tébuconazole [(*RS*)-1-*p*-chlorophényl-4,4-diméthyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylméthyl)-pentan-3-ol] (Figure 21) est un fongicide systémique commercialisé pour la première fois par Bayer AG, en Afrique du Sud, en 1988. Ce fongicide foliaire est connu pour sa pénétration rapide dans la feuille, suivie par sa migration lente et régulière vers l'intérieur de la plante. Plutôt lipophile, il est peu soluble dans l'eau (36 mg/L). Ayant un risque de volatilisation relativement modéré ($K_H = 1 \times 10^{-5} \text{ Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ à 25°C), ce composé, solide à température ambiante, est très stable à l'hydrolyse et la photolyse.

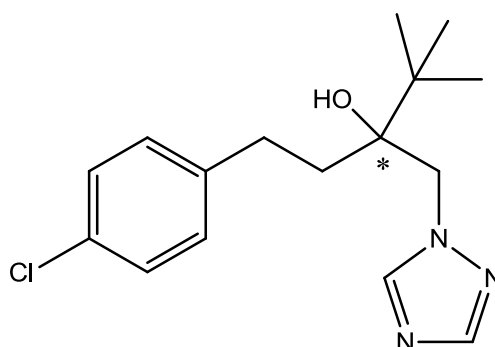


Figure 21 : Structure du tébuconazole

Le tébuconazole est principalement utilisé pour la lutte contre la fusariose de l'épi (*Fusarium*) et pour la suppression des maladies foliaires du blé (de printemps, d'hiver et dur), de l'orge, de l'avoine et du soja. La fusariose est une maladie courante du blé, qui peut entraîner des diminutions de 30 à 50% du rendement massique [Cosic *et al.*, 2006]. L'effet du tébuconazole sur la morphologie, la structure, les composés cellulaires de la paroi et la production de toxines (deoxynivalenol) d'une souche de *Fusarium culmorum* a été étudié en détails par Kang *et al.* [2001]. Ils ont observé notamment un retard important de la croissance fongique, l'épaississement des parois cellulaires avec un cloisonnement excessif des hyphes, la formation de cloisons incomplètes et de nouvelles structures d'inclusion dans les hyphes, une vacuolisation extensive et enfin une diminution forte de la production de toxines (Figures 22 et 23). Le tébuconazole semble même, indirectement, améliorer les réactions de défense de l'hôte infecté, les taux de β -1,3-glucanase et de lignine (deux agents connus pour être efficaces contre l'agression de pathogènes) dans les feuilles de blé infectées et traitées étant

beaucoup plus élevés que ceux observés dans les feuilles infectées et non traitées [Han *et al.*, 2006].

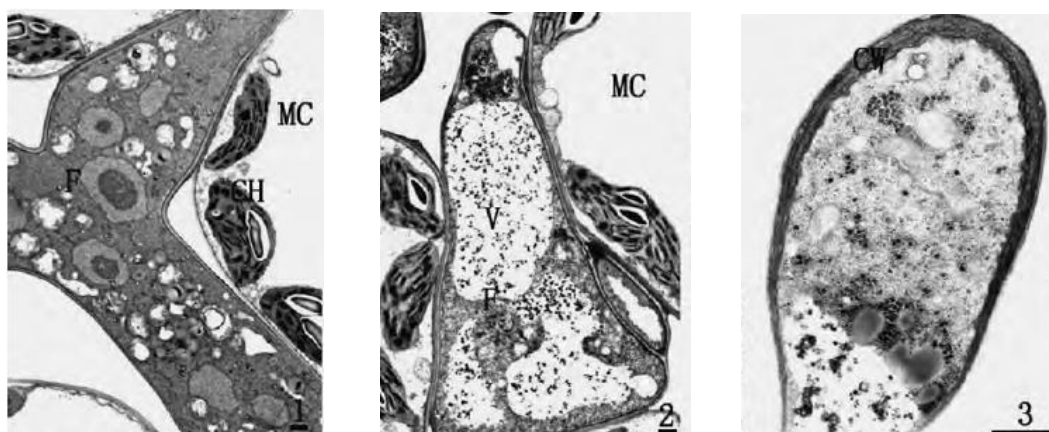


Figure 22 : Photographies obtenues par microscopie électronique à transmission des hyphes de *Puccinia striiformis* présents dans des feuilles de blé non traitées après 5 jours d'infection (1) et traitées par le tébuconazole (2 et 3) après 1 et 2 jours d'infection, respectivement. F = Cellule fongique ; MC = Cellule du mésophylle ; CH = Chloroplaste ; V = Vacuole ; C = Paroi cellulaire. 2 - Apparition de larges vacuoles dans le cytoplasme ; 3 - Epaississement des parois cellulaires de la cellule hyphale.

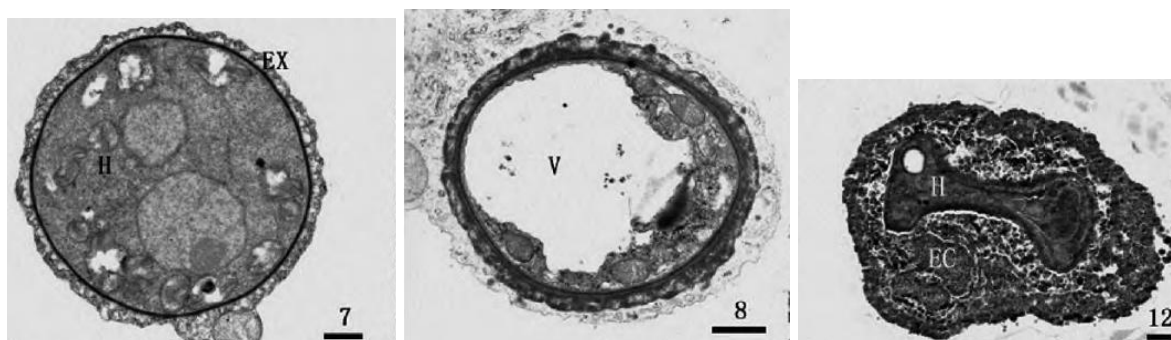


Figure 23 : Photographies obtenues par microscopie électronique à transmission d'haustoria (ou suçoirs) de *Puccinia striiformis* présents dans des feuilles de blé non traitées après 5 jours d'infection (7) et traitées par le tébuconazole (8 et 12) après 2 et 5 jours d'infection, respectivement. EC = Encaissement de l'haustorium ; H = Haustorium ; EX = Matrice extrahaustoriale ; V = Vacuole. 8 - Epaississement irrégulier de la paroi de l'haustorium, présence d'une large vacuole et élargissement de la matrice extrahaustoriale. 12 - Nécrose de l'haustorium.

Le tébuconazole est efficace contre d'autres maladies de blé, telles que le piétin causé par *Rhizoctonia cerealis* et le piétin-échaudage du blé causé par *Gaeumannomyces graminis*.

Il faut noter que ce fongicide est également très utilisé contre l'oïdium (la maladie du raisin la plus répandue dans le monde et causée par la souche *Uncinula necator*) [Cabras *et al.*, 1997], la rouille jaune, la septoriose du feuillage et la rouille brune. Il est également utilisé dans la préservation du bois brut ou manufacturé [Stavova *et al.*, 2011].

Le tébuconazole est commercialisé en France (et dans plus de 100 pays) sous forme d'émulsions contenant la matière active seule à 250 g/L (**Folicur**® et **Horizon**® de Bayer, **Balmora**® de PhytEurop) ou en mélange avec d'autres fongicides tels que **Matador**® (Tébuconazole 250 g/L + triadiménol 125 g/L), **Nativo**® (Tebuconazole 200 g/L + trifloxystobin 100 g/L), **Prosaro**® (Tebuconazole 125 g/L + prothioconazole 125 g/L)... La dose agronomique recommandée pour le blé est de 250 g/ha en un seul traitement.

III.2. Métabolisme du tébuconazole chez les mammifères

Le métabolisme du tébuconazole a été étudié chez différentes espèces de mammifères. Un certain nombre de données a été rassemblé dans le rapport de la FAO de 1994 [FAO / WHO, 1994]. Chez le rat, les études ont montré une absorption complète du tébuconazole, suivie par sa distribution dans le corps et son élimination rapide (91% dans la bile, 7% dans les urines et 2% dans les fécès – Temps de demie-vie dans le plasma de 32 à 52h pour des doses de 20 mg/kg). Le métabolisme du tébuconazole débute par une hydroxylation rapide en hydroxytébuconazole sur la chaîne aliphatique (HWG 2061) ou sur le noyau aromatique (ECW 4882), puis à des réactions successives d'oxydation et de glucuronidation (Figure 24).

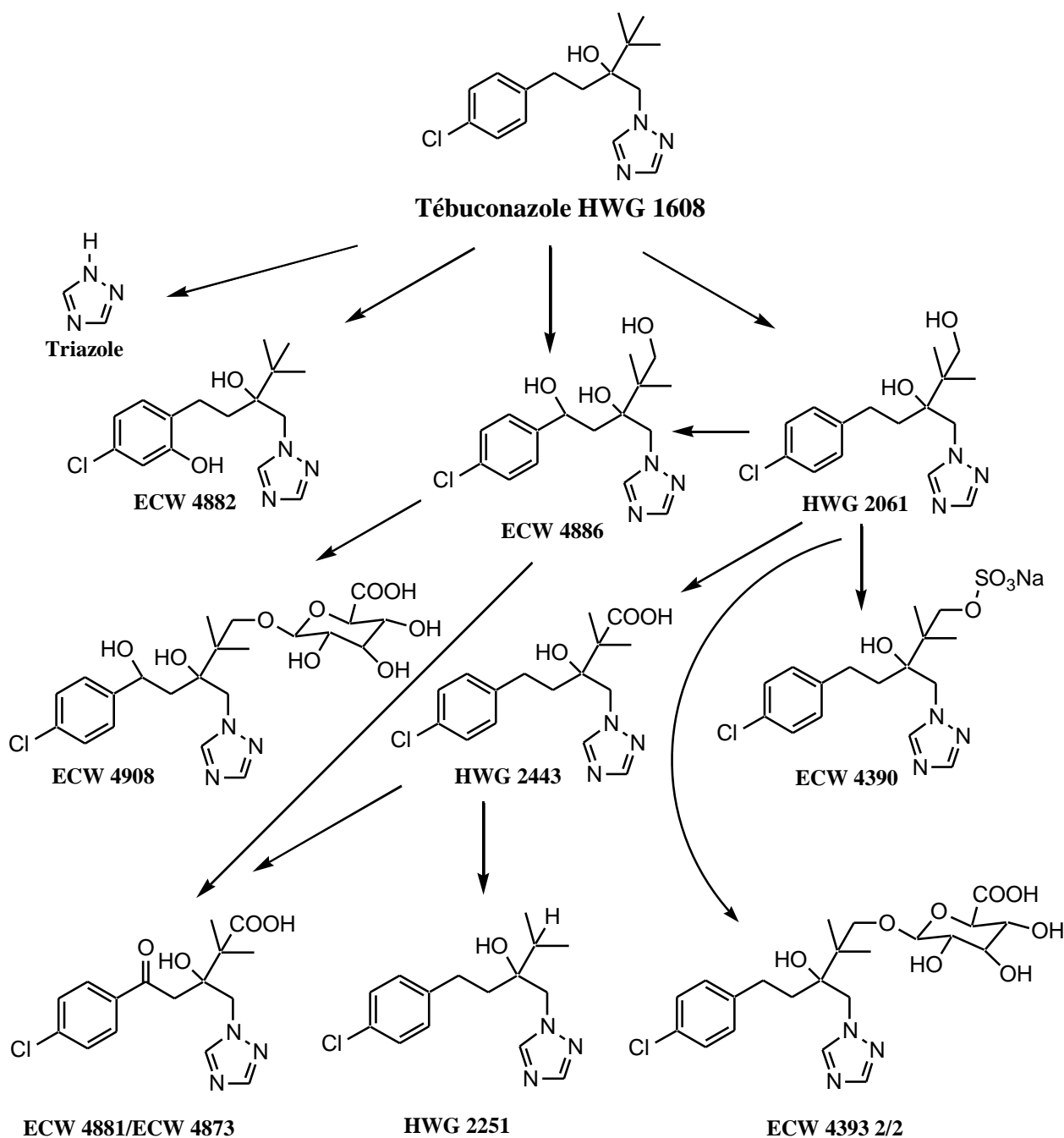


Figure 24 : Métabolisme du tébuconazole chez le rat (d'après le rapport FAO, 1994)

Le métabolisme du tébuconazole racémique a été étudié dans différents organes du lapin par Zhu *et al.* [2007] : foie, poumons, cœur, muscles... mais aussi dans le plasma. Ils ont constaté une forte accumulation dans les poumons juste après l'ingestion (30 mg/kg), qui diminue avec le temps lorsque ce composé est retrouvé dans les autres organes. Ils ont également observé un métabolisme stéréosélectif du foie, l'énantiomère (+) étant moins concentré que son antipode dans cet organe. De même dans le plasma, une disparition plus

rapide de l'énantiomère (+) par rapport à l'énantiomère (-) est observée. La fixation privilégiée d'un des énantiomères sur les nombreuses protéines du plasma a été proposée comme explication de ce phénomène.

III.3. Devenir du tébuconazole dans l'environnement

Les fongicides de la famille des triazoles sont des composés plutôt lipophiles et relativement persistants avec des temps de demie-vie allant de quelques semaines à plusieurs mois [Tomlin, 2003]. La contamination des eaux de surface par ces composés provient donc soit du lessivage (runoff) de champs agricoles ou de stocks de bois traités, soit du remplissage et nettoyage des outils agricoles (buses). Les quelques études, réalisées sur la présence de ces composés dans les eaux de surface et les eaux traitées après stations d'épuration, ont toujours montré la présence de tébuconazole et à des concentrations souvent les plus élevées du mélange de pesticides [Stamatis *et al.*, 2010]. Ainsi, il a été détecté dans des petits ruisseaux de la région de Brunswick (Allemagne du Nord) à des concentrations allant jusqu'à $9,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ [Berenzen *et al.*, 2005], dans des eaux de pluie ($12\text{-}187 \text{ ng.L}^{-1}$) [De Rossi *et al.*, 2003] aussi bien que quasi-systématiquement dans des effluents de stations d'épuration en France (Lyon, $5,8\text{-}43,3 \text{ ng.L}^{-1}$), Allemagne (Marbourg, 50 ng.L^{-1}), Suisse (10 stations d'épuration testées, $1\text{-}12 \text{ ng.L}^{-1}$) ou Grèce [Berenzen *et al.*, 2003 ; Baugros *et al.*, 2008 ; Kahle *et al.*, 2008 ; Stamatis *et al.*, 2010]. Sa principale voie de dissipation, dans les stations d'épuration, reste l'adsorption sur les boues activées, sa biodégradabilité étant très faible [Kahle *et al.*, 2008 ; Stamatis *et al.*, 2010]. Des études plus récentes sur les eaux de surface et souterraines dans la région viticole de La Rioja en Espagne, où 40 pesticides et produits de dégradation ont été suivis, ont montré la présence de tébuconazole dans plus de 60% des 250 prélèvements réalisés avec des concentrations pouvant dépasser les 270 ng.L^{-1} [Herrero-Hernandez *et al.*, 2013].

III.3.1. Processus de rétention dans les sols

Le tébuconazole est considéré comme ayant une mobilité de faible à modérée en fonction du type de sol et des conditions climatiques [FAO/WHO, 1994]. Peu d'études ont reporté des essais spécifiques d'adsorption/désorption et de mobilité du tébuconazole dans des sols [Bending *et al.*, 2007 ; Herrero-Hernandez *et al.*, 2011]. Elles montrent une corrélation positive entre adsorption et temps de contact avec une valeur de K_d qui augmente au fur et à

mesure que la proportion de fongicide dans la solution aqueuse du sol diminue ($K_d = 12,4 \text{ L.kg}^{-1}$ dans un sol marno-sableux le lendemain de l'épandage) [Bending *et al.*, 2007], mais aussi une certaine mobilité de ce composé, notamment juste après son application, puisqu'on en retrouve jusqu'à 50 cm de profondeur. Cependant, la teneur en résidus reste majoritairement dans l'horizon 0-10 cm du sol jusqu'à 355 jours après épandage [Herrero-Hernandez *et al.*, 2011]. Les valeurs de K_d reportées varient de 7,7 à $16,4 \text{ L.kg}^{-1}$ et celles de K_{oc} de 911 (limons) à 1251 L.kg^{-1} (sol marno-sableux) indiquant qu'une plus forte teneur en argile conduit à une plus forte adsorption [Komarek *et al.*, 2010]. La teneur en matière organique du sol [Berenzen *et al.*, 2005], mais aussi celle en matière organique dissoute (amendement) jouent également sur l'adsorption en l'augmentant pour des teneurs plus fortes [Komarek *et al.*, 2010 ; Herrero-Hernandez *et al.*, 2011]. Cadkova *et al.* [2012] ont comparé l'adsorption du tébuconazole pur et formulé (Folicur®) sur différents constituants du sol et sur des acides humiques. Ces auteurs ont montré une forte adsorption du tébuconazole sur les acides humiques mais également sur des minéraux tels que la ferrihydrite (grande surface spécifique) ou dans une moindre mesure la birnessite. L'adsorption est toujours beaucoup plus importante avec la formulation, à part dans le cas des acides humiques où l'affinité semble moindre. La compétition avec les nombreux additifs organiques présents dans la formulation pourrait expliquer ces résultats.

Le tébuconazole, comme l'ensemble des fongicides de la famille des triazoles, est considéré comme persistant avec des temps de demie-vie variant de semaines à plusieurs années (valeurs retrouvées dans la littérature allant de 49 à 610 jours) suivant les doses appliquées et le type de sol [FAO/WHO, 1994 ; Bromilow *et al.*, 1999 ; Munoz-Leoz *et al.*, 2011]. Lors d'études en champ, Strickland *et al.* (2004) ont trouvé un $t_{1/2}$ de seulement 49 jours pour une concentration initiale de 1 mg.kg^{-1} dans un sol marno-sableux à faible teneur en matière organique et dans un contexte de température relativement élevée (24°C) et de forte humidité. La dissipation a même été fortement accélérée après trois applications successives de tébuconazole ($t_{1/2} = 5$ jours) [Potter *et al.*, 2005]. Des valeurs relativement similaires ont été obtenues par Herrero-Hernandez *et al.* (2011) ($t_{1/2} \sim 12$ jours) dans un sol de vigne argilo-sableux quelle que soit la concentration initiale en tébuconazole (0,25 et $1,25 \text{ kg.ha}^{-1}$). Par contre, dans l'étude de Munoz-Leoz *et al.* [2011], la dissipation du tébuconazole dépend bien de la concentration initiale, puisque ces auteurs ont trouvé un temps de demie-vie de 9, 74 et 263 jours pour des applications de 5, 50 et 500 mg.kg^{-1} , respectivement. Les

conditions pédologiques mais aussi climatiques (température, teneur en eau du sol, précipitations...) jouent grandement sur le taux de dissipation de ce composé.

Transformation par voie photochimique

Le spectre d'adsorption dans l'UV et le visible du tébuconazole ($\lambda_{\text{max}} = 220,8 \text{ nm}$ et aucune absorption à $\lambda > 300 \text{ nm}$) ne montre aucun recouvrement avec le spectre solaire. Ce fongicide est donc photostable dans l'eau.

L'utilisation d'un photocatalyseur (TiO_2) conduit à la formation de nombreux produits de dégradation du tébuconazole, dont les majoritaires ont pu être identifiés par LC/MS (Figure 25). Tous ces produits ont été obtenus après 10 minutes d'irradiation, correspondant à la dégradation de 90% de la solution de tébuconazole à 20 mg.L^{-1} ($\text{TiO}_2 = 200 \text{ mg.L}^{-1}$) et s'inscrivent dans deux voies principales de photodégradation [Calza *et al.*, 2002].

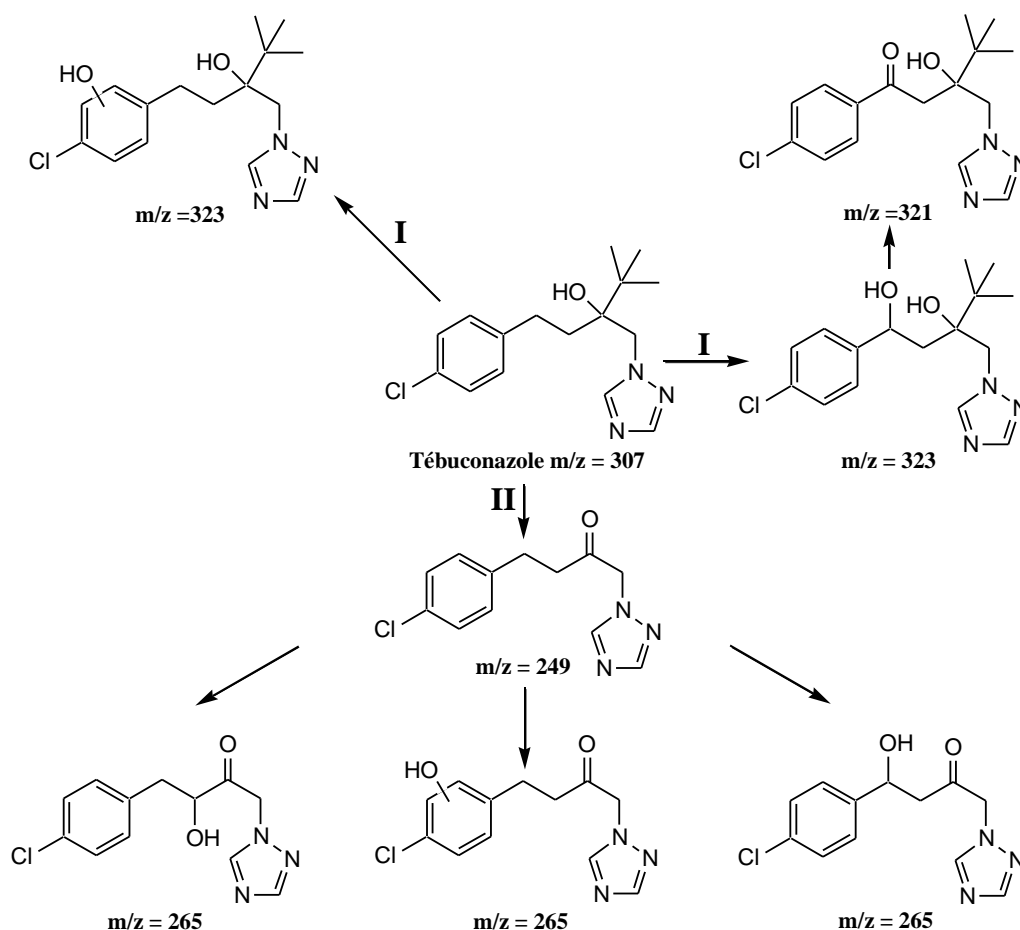


Figure 25 : Voies de photodégradation majoritaires du tébuconazole après 10 min d'irradiation en présence de TiO_2 (d'après Calza *et al.*, 2002)

Liang *et al.* [2009] ont suivi les cinétiques de photodégradation du tébuconazole dans différents sols en travaillant avec une lampe au mercure haute pression ($\lambda > 290$ nm, 300 W). Dans ces conditions, ils ont montré que cette cinétique est étroitement liée à la teneur en matière organique et en argile du sol et qu'elle est plus rapide avec l'augmentation de l'humidité, le tébuconazole étant alors plus mobile (Figure 26). Des corrélations négatives existent entre la vitesse de photodégradation et la concentration du tébuconazole (Figure 26). Il faut noter que le temps de demie-vie du tébuconazole, quelles que soient les conditions, est très court et varie entre 10 et 22 minutes.

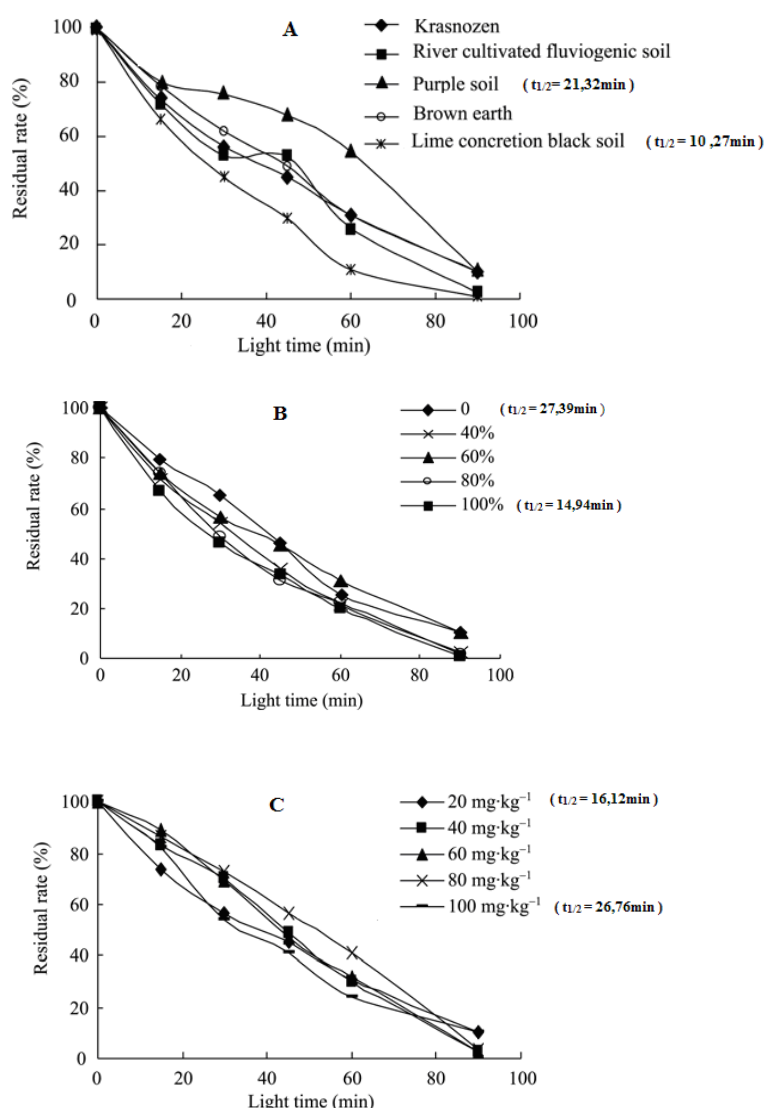


Figure 26 : Influence de (A) la nature du sol, (B) le taux d'humidité et (C) la concentration en tébuconazole sur sa cinétique de photodégradation sous lampe à mercure haute pression (d'après Liang *et al.*, 2009)

Transformation par voie biologique

Le tébuconazole n'est généralement que faiblement biodégradé qu'il soit dans l'eau ou dans le sol. Le taux d'abattement par ce processus dans les stations d'épuration [Stamatis *et al.*, 2010 ; Silva *et al.*, 2012] ou dans les procédés de compostage comportant une phase de digestion anaérobie suivie d'un traitement aérobie [Kupper *et al.*, 2008] est généralement faible à modéré (de 0 à 50% suivant les conditions). Dans les sols, les taux de dissipation observés ont pu être corrélés en partie à des processus de biodégradation, des métabolites ayant pu être identifiés [Strickland *et al.*, 2004 ; Potter *et al.*, 2005]. Il s'agit de produits d'hydroxylation et/ou de clivage du cycle chlorophényle (Figure 27).

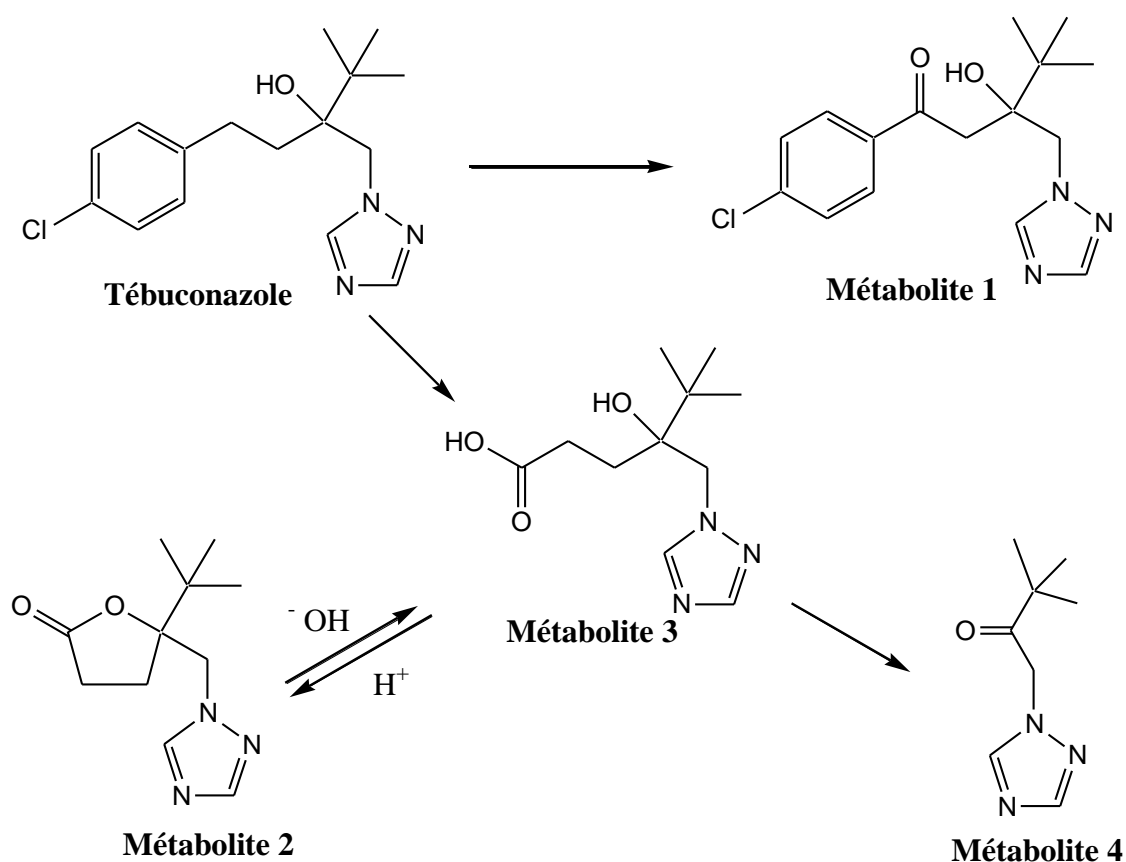


Figure 27 : Structures proposées pour les métabolites du tébuconazole isolés de sol (d'après Strickland *et al.*, 2004)

L'ensemble de ces métabolites représente 63% du mélange après 63 jours d'incubation, le composé **3** étant très majoritaire [Strickland *et al.*, 2004]. La répétition des applications de tébuconazole sur ce même sol entraîne une augmentation de la vitesse et du taux de dissipation du fongicide (84% après 63 jours et 3 applications) impliquant une adaptation de la communauté microbienne. Dans ces conditions, le métabolite **2** est observé

très majoritairement (92 à 97% du total des métabolites), le composé **3** n'étant même pas détecté sans doute du fait de sa transformation rapide en **2** [Potter *et al.*, 2005]. Seul le métabolite **1** a été retrouvé dans le sol de vignes amendé ou non [Herrero-Hernandez *et al.*, 2011]. Sa concentration augmente (max : 124 jours) puis diminue au cours du temps pour le sol non amendé. Dans le sol amendé, sa concentration est beaucoup plus faible et sa cinétique de formation et disparition est beaucoup plus lente. L'amendement entraîne une augmentation de la rétention du tébuconazole, le protégeant initialement de la biodégradation, puis la dégradation augmente quand la matière organique diminue.

D'autres études se sont plus particulièrement focalisées sur l'isolement de souches microbiennes dégradantes. Sehnem *et al.* (2010) ont, à partir de sols exposés historiquement au tébuconazole à des concentrations plus ou moins fortes, isolé dans un premier temps des consortia, puis à partir des consortia les plus actifs, onze souches bactériennes capables de dégrader le tébuconazole, qui appartiennent toutes aux genres *Pseudomonas*, *Enterobacter* et *Serratia*. Le consortium le plus efficace est composé des deux souches, *Enterobacter sakazakii* et *Serratia* sp. Il conduit à la dissipation de 47% du tébuconazole initial après 6 jours d'incubation pour une concentration initiale de 68 mg.L⁻¹. Ces auteurs n'ont pas cherché à identifier d'éventuels métabolites. Obanda *et al.* [2008, 2009] ont choisi une souche bactérienne (*Pseudomonas fluorescens* NCCB 82001) et quatre souches fongiques (une moisissure : *Trichoderma harzianum* ; une pourriture molle : *Chaetomium globosum* ; une pourriture blanche : *Phanerochaete chrysosporium* et une pourriture brune : *Meraliporia incrassata*) et ont testé leur capacité à dégrader le tébuconazole. Seul *P. chrysosporium* ne biotransforme pas le fongicide. Pour les autres souches, les taux de dégradation varient entre 40 et 70%. Des analyses par LC-MS et IR des milieux en fin d'incubation ont permis d'identifier des métabolites et de proposer un schéma commun de biodégradation, impliquant notamment une ouverture du cycle triazole et des réactions d'oxydation du groupement *tert*-butyle (Figure 28). Contrairement aux travaux précédents, aucun métabolite issu de réactions de déchloration ou du clivage oxydatif du noyau aromatique n'a été observé. Il faut également noter que dans ces études, la biosorption n'est qu'un processus mineur puisque contribuant pour < 1%.

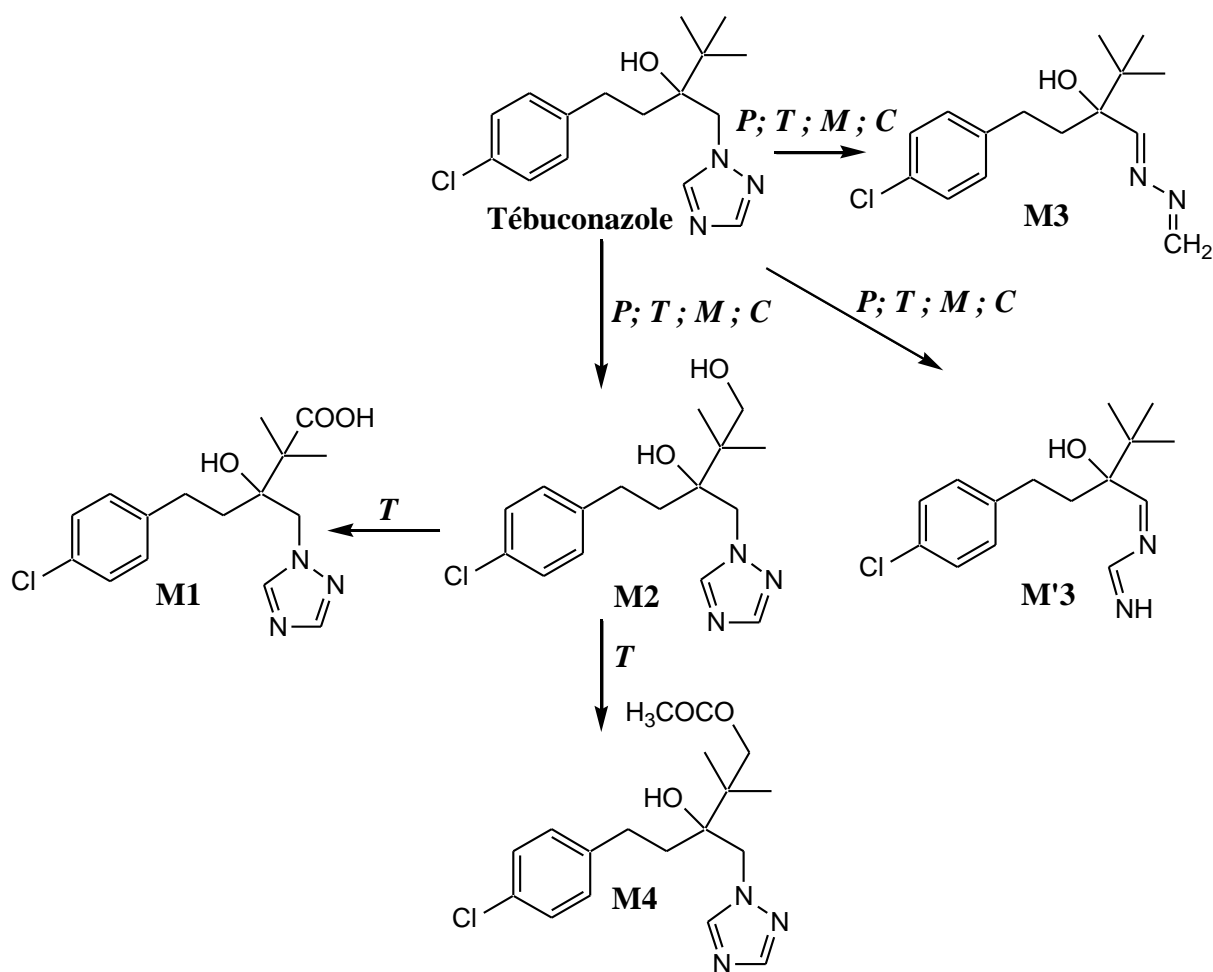


Figure 28 : Schéma métabolique proposé du tébuconazole par *Trichoderma harzianum* (T), *Meraliporia incrassata* (M), *Chaetomium globosum* (C) et *Pseudomonas fluorescens* (P) (d'après Obanda *et al.*, 2008 et 2009)

Le tébuconazole étant largement utilisé dans la protection des bois, des travaux plus récents ont porté sur sa biodégradation par des souches fongiques sur une matrice bois [Woo *et al.*, 2010]. Des disques de bois d'épicéa imprégnés de tébuconazole à 3 concentrations (0,19 ; 0,39 et 0,77 kg.m³) sont placés dans des boîtes de Pétri contenant un milieu de culture gélosé, préalablement inoculés avec différentes souches de champignons cellulolytiques. Ces boîtes sont incubées pendant 21 jours à l'abri de la lumière, puis les disques sont extraits et leurs contenus analysés. Deux souches, *Trametes versicolor* et *Fomitopsis palustris*, se sont révélées capables de dégrader respectivement 45 et 53 % du tébuconazole initial pour la plus forte concentration. Les métabolites n'ont pas été identifiés. Il faut noter que ces auteurs ont également testé, dans les mêmes conditions, une souche de *Trichoderma harzianum* sans succès.

III.4. Impact du tébuconazole - Toxicité

Le tébuconazole est considéré comme modérément toxique avec des DL_{50} chez le rat de 1,7 g/kg par voie orale et supérieure à 2 g/kg par contact avec la peau [EFSA, 2008]. Cependant, plusieurs études ont montré son potentiel à risques, notamment lors d'exposition prénatale, sur l'apprentissage cognitif, le développement de neuropathologies [Moser *et al.*, 2001] ou en tant que perturbateur endocrinien [Taxvig *et al.*, 2007 ; Kjaerstad *et al.*, 2010]. Il augmente la durée de gestation et influe sur les niveaux d'hormones stéroïdiennes chez le fœtus [Taxvig *et al.*, 2007]. Différents mécanismes d'action sur la biosynthèse de ces hormones ont été mis en évidence. Le tébuconazole entraîne une diminution de la formation d'œstradiol et de testostérone et augmente la formation de progestérone, ce qui implique une inhibition des enzymes impliquées dans la conversion de la progestérone en testostérone. Il agit également en tant qu'antagoniste du récepteur androgène conduisant à une féminisation de la progéniture des rats [Taxvig *et al.*, 2008 ; Kjaerstad *et al.*, 2010]. Par contre, aucun effet sur les systèmes immunologique ou de reproduction n'a été constaté dans l'étude de Moser *et al.* [2001].

Le compartiment aquatique est le réceptacle terminal de ces pesticides et de nombreuses études ont porté sur la toxicité et le facteur de bioconcentration du tébuconazole sur divers organismes non cibles de ce milieu. Les données de toxicité aiguë varient suivant les espèces : $LC_{50-96h} = 45 \text{ mg.L}^{-1}$ pour le guppy (*Poecilia reticulata*) [Lebkowska *et al.*, 2003], $5,3 \text{ mg.L}^{-1}$ pour des alevins de poisson chat argenté (*Rhamdia quelen*) [Kreutz *et al.*, 2008], $26,8 \text{ mg.L}^{-1}$ pour le poisson zèbre (*Danio rerio*) [Andreu-Sanchez *et al.*, 2012] ou $2,37 \text{ mg.L}^{-1}$ pour la carpe [Toni *et al.*, 2011]. L'utilisation de la formulation, Folicur®, dans les travaux de Kreutz *et al.* [2008] et Toni *et al.* [2011], peut expliquer la plus grande toxicité observée dans ces deux études. Les concentrations toxiques trouvées sont de toute façon plus importantes que la concentration d'application utilisée dans l'agriculture. Le tébuconazole ne devrait donc pas causer la mort des poissons sauf à la suite d'accidents. Un autre paramètre important est le devenir du pesticide dans le poisson et notamment sa possible bioaccumulation. Là encore, les études sont espèces spécifiques : le temps de demie-vie du tébuconazole chez le poisson zèbre est de 24 jours et le temps nécessaire pour éliminer 95% de la concentration maximale est de 105 jours [Andreu-Sanchez *et al.*, 2012] tandis que chez la truite arc-en-ciel juvénile, le $t_{1/2}$ est de 1 jour [Konwick *et al.*, 2006]. Le facteur de bioconcentration ($BCF = \text{Concentration}_{\text{organisme}} / \text{Concentration}_{\text{eau}}$ à l'état d'équilibre) trouvé

par Andreu-Sanchez *et al.* [2012] est relativement modéré ($38,80 \text{ L.kg}^{-1}$). Des études plus poussées ont montré l'impact du tébuconazole sur le métabolisme énergétique de *Daphnia magna* [Sancho *et al.*, 2009], avec une diminution des réserves énergétiques (glycogène et surtout lipides) et un ralentissement du taux d'ingestion, d'autant plus importantes que la concentration en tébuconazole est forte. Même si ce fongicide ne présente qu'une toxicité aigüe relativement modérée pour cet organisme, des facteurs de risque à long terme pourraient donc exister en cas de contamination chronique. Des effets relativement similaires ont été observés chez la carpe avec de fortes perturbations du processus oxydatif et des modifications du métabolisme des protéines et des sucres [Toni *et al.*, 2011].

L'impact du tébuconazole sur des champignons aquatiques, considérés comme non cibles, a été également étudié [Dijksterhuis *et al.*, 2011]. Les valeurs de NOEC (No Observed Effect Concentrations) obtenues sont relativement faibles pour certaines souches : par exemple, $0,008 \text{ mg.L}^{-1}$ pour *Cryptococcus flavescens* ou *Trichoderma hamatum*. Ces champignons, qui jouent un rôle clef dans la décomposition et le recyclage des nutriments, pourraient donc être gravement affectés sur le long terme.

De nombreux auteurs se sont également intéressés à l'impact du tébuconazole sur les communautés microbiennes du sol. Les résultats obtenus sont assez contradictoires : Strickland *et al.* [2004] et Bending *et al.* [2007] n'observent aucun effet sur la biomasse microbienne après addition du tébuconazole à une concentration de 1 et 5 mg.kg^{-1} respectivement, tandis que Cycon *et al.* [2006] ne trouvent une réduction de cette biomasse qu'après ajout d'une forte concentration (270 mg.kg^{-1}) et Munoz-Leoz *et al.* [2011] en notent une, systématique, dès addition de 5 mg.kg^{-1} de tébuconazole, avec une diminution d'autant plus importante que la concentration en tébuconazole est forte. Ces résultats peuvent s'expliquer par des types de sol et des protocoles expérimentaux utilisés différents: mode d'épandage, utilisation de la molécule active ou de la formulation du tébuconazole... Plusieurs indicateurs de l'activité microbienne ont également été suivis après exposition: l'activité déshydrogénase (DHA) a été stimulée par le fongicide sans effet de la dose de tébuconazole appliquée dans l'étude de Herrero-Hernandez *et al.* [2011] alors que cette activité a diminué de 10% par rapport au sol contrôle non traité après un mois d'incubation pour Bending *et al.* [2007] ; les activités uréase, arylsulfatase, β -glucosidase et phosphatase alcaline, jouant respectivement un rôle clef dans les cycles de l'azote, du soufre, du carbone et du phosphore, ont été fortement inhibées (diminution moyenne de l'activité au bout de 90

jours de 93, 87, 69,5 et 49% respectivement par rapport au contrôle) et ce dès une concentration de 5 mg.kg⁻¹, indiquant un impact sévère sur les communautés microbiennes [Munoz-Leoz *et al.*, 2011]. Cet effet sur le cycle de l'azote a également été observé par Cycon *et al.* [2006], avec notamment une inhibition marquée de la nitrification (étape la plus importante dans les sols) suite à l'application du fongicide, puis un retour à des valeurs voisines de celles obtenues dans les contrôles lorsque le tébuconazole a disparu ou n'est plus bioaccessible [Munoz-Leoz *et al.*, 2011]. Ces effets pourraient également s'expliquer par l'effet de ce fongicide sur la diversité et la structure globale des communautés microbiennes. Si Bending *et al.* [2007] n'ont pas observé d'effet sur ce paramètre, à part un léger impact sur les protozoaires, Cycon *et al.* [2006] ont noté une forte diminution du nombre de champignons pendant les 14 premiers jours d'incubation concomitante avec une forte augmentation des bactéries hétérotrophes, stimulées sans doute par le relargage de nutriments et de sources d'énergie par les champignons morts. Ce changement dans la structure des communautés fongiques, mais aussi dans leurs fonctions (diminution de l'efficacité des enzymes extracellulaires responsables de la dégradation de la matière organique), a également été souligné par Artigas *et al.* [2012] lors d'études sur les communautés dégradantes de la litière de feuilles. Une diminution moyenne de 29% de la biomasse fongique et de 19% de la biomasse bactérienne a été observée pour les feuilles d'aulne et de peuplier dans l'eau. Cependant la réponse de ces communautés diffère en fonction de la qualité de la litière. Il semble donc que le tébuconazole puisse avoir un impact fort, mais transitoire, sur les communautés microbiennes du sol.

Le tébuconazole est un fongicide largement utilisé à l'échelle mondiale. Etant relativement persistant dans les différents compartiments de l'environnement, il peut constituer un risque écologique malgré sa faible mobilité dans les sols. Le tébuconazole est cependant très souvent détecté dans les influents et effluents de nombreuses stations d'épurations européennes. Sa biodégradabilité est très faible même si quelques souches bactériennes et fongiques ont été montrées comme capables de biotransformer efficacement ce fongicide. Soupçonné d'être un perturbateur endocrinien, il montre également un impact important sur les microorganismes aquatiques et terrestres, notamment à long terme.

Impact de la formulation et de l'utilisation de cocktails de pesticides sur leur devenir

L'amélioration de l'efficacité des pesticides vis-à-vis de la cible visée est passée par différentes étapes dont le développement de formulations plus adaptées, avec des adjuvants permettant une meilleure stabilité chimique des matières actives [Foy et Pritchard, 1996] mais surtout une augmentation de la dispersion et de l'adhésion des gouttelettes de spray sur la surface végétale, une plus grande facilité pour la pénétration dans les cellules, et la limitation des effets de « drift » lors de l'épandage. Ces adjuvants peuvent, suivant les utilisations, être présents dans la formulation commercialisée (on parle alors d'additifs de formulations) ou bien même être ajoutés juste avant l'épandage (« Tank mix » adjuvants) [Nobels *et al.*, 2011]. La plupart des études sur l'effet des adjuvants porte sur l'amélioration des propriétés de la matière active en leur présence en termes d'efficacité et de rendement de production. Par contre, très peu d'études s'intéressent à leur toxicité et à leur devenir dans l'environnement, ou à leur impact sur le comportement environnemental de la matière active. La nouvelle directive Européenne (EG) 1107/2009, mise en place en juin 2011, vise à développer les connaissances sur l'(éco)toxicologie de ces adjuvants et donc à les intégrer dans l'évaluation des risques globaux du produit phytosanitaire. De même, dans un autre cadre, la directive REACH (Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques) a pour objectif d'assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine et l'environnement contre les risques que peuvent poser les produits chimiques, en général. A terme, *via* ces deux réglementations, certains de ces additifs pourraient donc être interdits.

Plus récemment, l'application de mélanges de pesticides formulés de manière simultanée ou séquentielle rapprochée, s'est généralisée afin d'améliorer l'efficacité visée en élargissant le spectre d'action et d'organismes ciblés mais aussi en réduisant le dosage de chaque pesticide appliqué [Li *et al.*, 2008], et le coût d'épandage. Plusieurs travaux ont mis en évidence cette efficacité renforcée lors d'une application combinée de deux (ou plusieurs) herbicides ou fongicides. Par exemple, Matthies et Buchenauer [2000] ont noté lors d'études au champ, que des applications simultanées de Folicur® (tébuconazole) et Sportak®

(prochloraz) diminuaient de manière beaucoup plus efficace le développement de la fusariose et donc augmentaient le rendement en blé (~ + 30%) que chaque fongicide seul (+ 22% pour Folicur® et + 17% pour Sportak®). De même, la mésotrione, très efficace contre les adventices dicotylédones, ne l'est pas contre les graminées. Un herbicide plus actif contre ces dernières (nicosulfuron) est utilisé en combinaison avec la mésotrione afin d'assurer un contrôle suffisamment efficace [Grzegorz *et al.*, 2011]. Ainsi des mélanges en cuve de la mésotrione et du nicosulfuron peuvent améliorer le contrôle des dicotylédones et de plusieurs espèces de graminées annuelles en une seule application [Whaley *et al.*, 2006]. D'autres combinaisons de la mésotrione avec différents herbicides permettent d'élargir le spectre d'action du traitement attendu ; par exemple, des mélanges de mésotrione et d'atrazine ont permis d'obtenir des effets synergiques sur différents adventices comme l'amarante à racine rouge (sensible ou résistante aux triazines) [Creech *et al.*, 2004 ; Hugie *et al.*, 2008]. Ce cocktail a augmenté le taux de nécrose des tissus par rapport à la progression plus lente des symptômes de blanchiment normalement associés à la mésotrione seule [Armel *et al.*, 2005].

Si les études sur le devenir d'un pesticide donné dans différentes conditions environnementales, et sur son impact potentiel sur divers organismes non-cibles se sont multipliées, la prise en compte des pratiques agricoles réelles, à savoir l'épandage de mélanges de composés comprenant diverses matières actives et adjuvants (souvent des tensioactifs mais pas uniquement), ne fait qu'émerger dans la littérature scientifique.

En effet, si l'un des objectifs visés de ces différentes approches est de diminuer les doses appliquées de chaque matière active, ces « nouveaux » procédés conduisent à l'existence d'une multi-contamination des sols, le comportement de chaque pesticide individuellement pouvant être grandement affecté par la présence des autres. Par exemple, les tensioactifs des formulations peuvent avoir des interactions complexes avec les contaminants déjà présents dans le sol, en augmentant leur solubilité et en agissant en tant que catalyseurs durant les processus de dégradation du fait de leurs propriétés de surface spécifiques [Haigh, 1996]. Ainsi de nombreux effets synergiques, antagonistes, compétitifs peuvent exister dans ces conditions et influencer sur le devenir et l'impact de chaque composé isolé. La compréhension des interactions possibles entre les constituants du mélange et le milieu environnemental, qu'il s'agisse simplement d'effets physico-chimiques (par exemple compétition pour des sites d'adsorption du sol) mais aussi d'impact sur l'abondance et la diversité de populations microbiennes du sol ou sur des réactions enzymatiques spécifiques

est donc indispensable pour avoir une bonne vision d'ensemble et plus réaliste du devenir de pesticides après leur application. A ce jour, peu d'études comparant le comportement d'un pesticide donné dans un environnement donné (dissipation, biodégradation, photodégradation), seul ou en mélange, ont été publiées, qu'il s'agisse de comparaisons matière active pure et matière active formulée ou pesticide seul et en mélange, si ce n'est dans le domaine de la toxicité.

Remarque : Il faut souligner qu'il n'est pas toujours facile de trouver la littérature correspondante, car peu d'auteurs indiquent dans les mots clefs les termes « mélanges » ou « combinaison », préférant citer chaque pesticide étudié. De plus, nous n'avons retenu que les publications comparant matière active et mélanges et pas celles portant directement sur des essais avec des mélanges. Quoi qu'il en soit, cette partie ne se vante pas d'être exhaustive.

I. Impact de la formulation et des adjuvants

Les pesticides sont communément épandus sous forme de formulations, ce qui permet d'avoir des dosages plus importants en matière active, aussi bien en phase liquide que solide [Beigel *et al.*, 1999], ces formulations pouvant également être mélangées avec des adjuvants dans la cuve de préparation juste avant l'épandage pour améliorer l'efficacité du pesticide. Tous ces additifs peuvent influencer sur la dégradation des pesticides en modifiant leur biodisponibilité : par exemple, certains surfactants améliorent la solubilité apparente de composés peu solubles dans l'eau et réduisent leur adsorption sur le sol [Haigh, 1996] ou évitent une importante volatilisation du pesticide [Swarcewicz *et al.*, 1998]. Ils peuvent aussi influencer sur la photodégradation, en activant ce processus, car ils assurent une meilleure répartition et adhésion sur les feuilles de plantes. Ainsi Ter Halle *et al.* [2010] ont montré que la mésotrione et le nicosulfuron formulés avaient des temps de demie-vie beaucoup plus courts à la surface de films de cire que les matières actives seules, les additifs de la mésotrione étant beaucoup plus photoinducteurs que ceux du nicosulfuron (Figure 29).

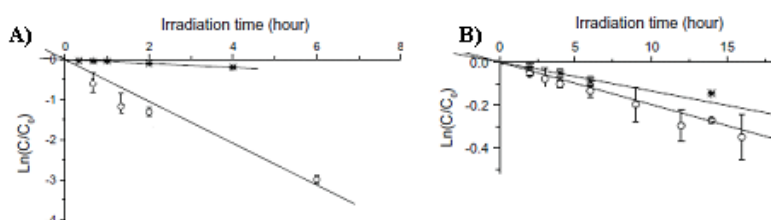


Figure 29 : Disparition photochimique (A) de la mésotrione et (B) du nicosulfuron purs (*) et formulés (O) (d'après Ter Halle *et al.*, 2010)

Par contre, des études sur la dégradation et l'évolution en termes de résidus liés d'un fongicide pur et formulé appartenant à la famille des triazoles, le triticonazole, dans les sols n'ont pas montré de différences significatives [Beigel *et al.*, 1999]. Aux doses agronomiques, la biodisponibilité de ce fongicide n'est pas affectée, ni la croissance et l'activité des microorganismes du sol. Il faut augmenter les dosages de manière importante pour observer de fortes modifications (diminution) dans la minéralisation de ce composé [Charnay *et al.*, 2000].

Les adjuvants peuvent être classés en trois grandes catégories majoritaires: les surfactants, les solvants et les composés synergiques (Figure 30) [Nobels *et al.*, 2011].

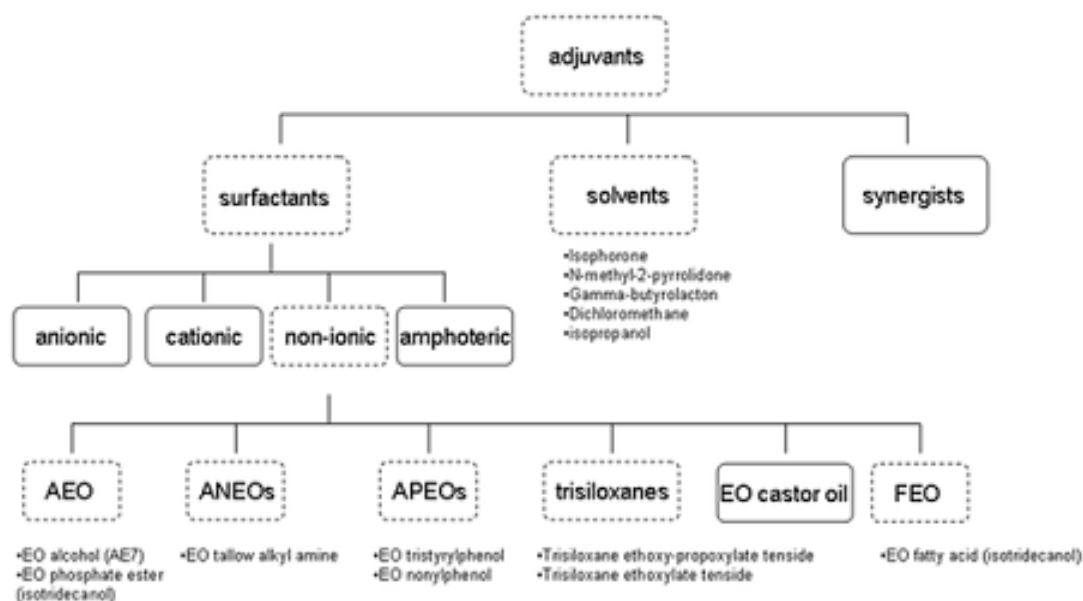


Figure 30 : Présentation des trois grandes classes d'adjuvants. AEO : Ethoxylates d'alcool ; ANEOs : Ethoxylates d'alkylamine ; APEOs : Ethoxylates d'alkylphénol ; FEO : Ethoxylates d'acides gras (d'après Nobels *et al.*, 2011)

Plusieurs travaux ont suivi la dissipation de pesticides dans les sols en présence d'adjuvants appartenant à ces différentes classes. Toutes ont montré une absence d'effet [Kucharski et Sadowski, 2009 ; Swarcewicz et Gregorczyk, 2013] ou une persistance accrue de la matière active, mais variable, suivant le type d'adjuvants présent. Ce dernier phénomène est considéré suivant les auteurs:

- comme un effet positif : meilleure efficacité vis-à-vis de la cible [Ryckaert *et al.*, 2007], diminution de la vitesse de dissipation dans les sols et donc limitation de l'écoulement vers les nappes phréatiques [Kucharski et Sadowski., 2011] ou de la volatilisation (cas du fongicide trifluraline) [Swarcewicz *et al.*, 1998] ;

- comme un effet négatif : augmentation des résidus de fongicides sur le plant de blé ou de laitue, même jusqu'à 4 semaines après l'application [Ryckaert *et al.*, 2007], d'où un risque accru de contamination du consommateur [Nobels *et al.*, 2011].

La composition des adjuvants peut ainsi avoir un impact faible ou considérable sur la persistance des pesticides dans le sol. Par exemple, les alcools polyéthoxylés ont des effets plus faibles (voire nuls) par rapport aux huiles méthylées [Beigel *et al.*, 1999 ; Kucharski et Sadowski., 2009]. Les hypothèses pour expliquer cette dissipation généralement ralentie de la matière active de pesticide sont :

- soit une augmentation de l'effet toxique. Plusieurs études ont montré le caractère toxique de ces adjuvants. Ainsi ceux présents dans plusieurs formulations du glyphosate, en particulier les alkylamines polyéthoxylées, ont défié la chronique en se révélant beaucoup plus toxiques que la matière active aussi bien sur des organismes aquatiques [Giesy *et al.*, 2000 ; Howe *et al.*, 2004 ; Brausch et Smith, 2007] que sur des cellules humaines [Benachour et Séralini, 2009 ; Mesnage *et al.*, 2012]. La difficulté réside dans le fait que la plupart des composés ne déclenche pas l'induction d'un seul mécanisme spécifique d'action dans l'organisme, mais une combinaison de voies conduisant à une certaine toxicité. Il peut donc être difficile de catégoriser les composés suivant leur effet [Nobels *et al.*, 2011],

- soit une augmentation de l'adsorption et donc une diminution de la biodisponibilité, en particulier pour les dérivés des huiles [Swarcewicz et Gregorczyk, 2013].

Une seule publication montre une diminution du temps de latence et une augmentation de la dissipation en présence de Tween-20. Il s'agit d'un mélange d'atrazine et de bentazone formulées, auquel est rajouté ce surfactant [Li *et al.*, 2008]. Si l'adjuvant n'a aucun effet sur l'atrazine, la dégradation de la bentazone, elle, est accélérée. Les auteurs proposent un effet boostant de l'adjuvant sur les populations microbiennes bentazone-dégradantes du sol.

II. Impact des mélanges de pesticides sur leur devenir et leur toxicité

L'épandage de mélanges de pesticides (ou cocktails) est devenu une pratique agricole courante permettant une économie de coût (matières actives et épandages) tout en augmentant

l'efficacité sur les cultures. Cependant, peu d'études prennent en compte ces nouvelles pratiques, et en particulier les interactions possibles et l'impact d'un pesticide sur le devenir environnemental d'un autre.

II.1. Impact sur les processus de photodégradation

Ter Halle et *al.* [2010] ont comparé le comportement photochimique de la mésotrione et du nicosulfuron (herbicide de la famille des sulfonyles) formulés, seuls ou en mélange sur un film de cire représentant la surface des feuilles. Les auteurs ont pu mettre en évidence une forte accélération de la photodégradation des deux herbicides formulés en mélange (Tableau 1). Deux hypothèses sont proposées pour expliquer ces résultats:

- la teneur en adjuvants par rapport à une matière active donnée est deux fois plus importante dans le mélange, ces additifs permettant une meilleure répartition de la matière active sur la feuille et donc une meilleure exposition à la lumière ;
- l'effet photosensibilisateur d'une matière active sur l'autre, la mésotrione pouvant former des états triplets réactifs pour le nicosulfuron et ce dernier étant plus susceptible de former des radicaux hydroxyles qui attaqueraient la mésotrione.

Tableau 1 : Temps de demie-vie de la mésotrione et du nicosulfuron formulés, seuls ou en mélange

	Temps de demie-vie (h)
Mésotrione formulée	2,2 ± 0,1
(Mésotrione + Nicosulfuron) formulés	0,9 ± 0,3
Nicosulfuron formulé	32,3 ± 2,5
(Nicosulfuron + Mésotrione) formulés	21,3 ± 1

II.2. Impact sur les processus de biodégradation par des communautés mixtes

La recherche de consortia microbiens, capables de dégrader des mélanges de pesticides appartenant à différentes familles chimiques et donc utilisables en bioremédiation, a poussé certains groupes à comparer leur efficacité vis-à-vis de différents mélanges, dans des conditions de culture définies.

Les effets observés sont très variables suivant les molécules en présence et leurs concentrations relatives. Grigg *et al.* [1997] se sont intéressés à la biodégradation de l'atrazine seule et en mélange binaire avec d'autres herbicides de la même famille (simazine et cyanazine) ou d'autres herbicides « co-contaminants » appartenant à des familles chimiques différentes (alachlore, métolachlore, trifluraline) par une culture mixte minéralisant l'atrazine. La disparition de l'atrazine, ainsi que la formation de son métabolite, l'hydroxyatrazine, ne sont pas affectées de manière significative par la présence d'un autre pesticide, qu'il s'agisse d'une triazine ou non. Par contre, le mélange avec deux « co-contaminants » ou trois entraîne une augmentation de la demie-vie de l'atrazine allant jusqu'à plus de trois fois celle observée pour l'atrazine seule (Tableau 2).

Tableau 2 : Temps de demie-vie de l'atrazine en présence d'autres herbicides co-contaminants par une culture mixte microbienne dégradant l'atrazine

	Temps de demie-vie (jours)
Pas de co-contaminant	1,0
alachlore + métolachlore	1,4
métolachlore + trifluraline	2,0
alachlore + trifluraline	2,3
alachlore + métolachlore + trifluraline	3,6

Il faut noter que dans les mélanges binaires avec les autres triazines, si la biodégradation de l'atrazine n'est pas affectée, celle de la simazine, de structure très proche de celle de l'atrazine, est fortement ralentie et celle de la cyanazine est accélérée, même si ses métabolites persistent aussi longtemps avec le mélange ou l'herbicide seul. La réponse microbienne est donc très spécifique.

Pino et Penuela [2011] ont, eux, évalué la capacité d'un consortium microbien, isolé à partir de sol très pollué, à dégrader simultanément deux insecticides, le méthylparathion et le chlorpyrifos, en culture liquide dans un but d'utilisation en bioremédiation. Ils ont montré que si ce consortium dégradait chacun des pesticides individuellement totalement en 5 jours d'incubation, le taux de dégradation diminuait fortement dans ce même temps lorsqu'ils étaient en mélange: 72% pour le méthylparathion et 39% pour le chlorpyrifos. Cet effet inhibiteur pourrait s'expliquer soit par un effet compétitif des microorganismes vis-à-vis des nutriments présents, soit par une augmentation de toxicité liée à la présence/ l'accumulation

d'un métabolite toxique. Le TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), métabolite du chlorpyrifos a effectivement montré une plus forte toxicité que la molécule parent et pourrait expliquer le phénomène observé. Cependant, l'addition de glucose dans le milieu a permis la dégradation complète des pesticides en mélange en 5 jours.

II.3. Comparaison de la dissipation d'un pesticide seul ou en mélange dans les sols

Les études de dissipation d'un pesticide donné, seul ou en mélange, dans le sol ont montré, suivant les publications, un effet positif, négatif ou pas d'effet sur sa persistance.

Quelques auteurs [Stojanovic *et al.*, 1972 ; Ogunseitan et Olson, 1993] ont montré qu'en mélange ou en présence d'un métabolite, les pesticides étaient plus facilement dégradés qu'individuellement, les microorganismes ayant alors une variété de substrats et de sources de carbone potentielles plus importante. White *et al.* [2010] ont étudié l'effet sur la cinétique de dégradation du métolachlore ($DT_{50} = 56$ jours) de différents fongicides : tébuconazole, flutriafol, chlorothalonil et cyproconazole. La vitesse de dégradation est accélérée en présence des fongicides de la famille des azoles, notamment avec le tébuconazole (Figure 31) tandis qu'elle est fortement ralentie en présence de chlorothalonil ($DT_{50} = 99$ jours). Les auteurs ont proposé que dans ce dernier cas, la disparition plus lente du métolachlore était liée à un mécanisme commun de métabolisme de ces deux molécules et donc à un effet de compétition.

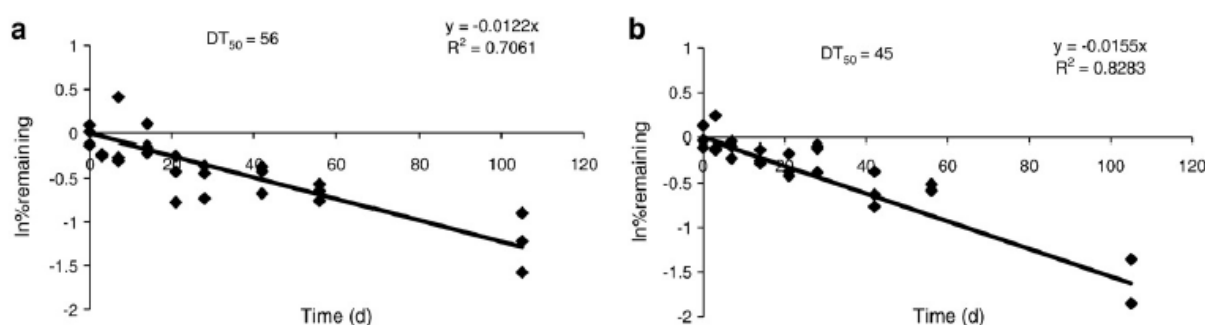


Figure 31 : Régression linéaire du métolachlore restant dans (a) le sol témoin et (b) un sol traité avec le tébuconazole (d'après White *et al.*, 2010)

D'autres ont plutôt observé une absence d'effet significatif: pas de changement de vitesse de dégradation seul ou en mélange pour l'isoproturon et le chlorothalonil dans un sol

« biomixé » (type Biobac®) [Fogg *et al.*, 2003], le chlorpyrifos et le chlorothalonile [Chu *et al.*, 2008] et pas d'influence du S-métolachlore sur la minéralisation de l'atrazine par *Pseudomonas* sp. ADP [Viegas *et al.*, 2012].

Cependant, tout dépend des conditions, du type de sol mais aussi des concentrations des pesticides en présence ou de leur nature. Par exemple, Fogg *et al.* [2003], qui n'ont pas trouvé de différence significative sur les vitesses de dégradation de l'isoproturon et du chlorothalonile seul ou en mélange dans un sol de Biobac®, ont observé un effet inhibiteur du mélange dans un sol de surface, allongeant le temps de demie-vie de l'isoproturon de plus de 4 fois ($T_{1/2} = 18,5$ jours pour l'isoproturon seul et 71,5 jours pour l'isoproturon en mélange). Chu *et al.* [2008] n'ont pas observé d'influence du chlorothalonile sur la dégradation du chlorpyrifos alors qu'une forte inhibition a été rapportée par Singh *et al.* [2002]. Un effet de concentration semble être à l'origine de cette différence, Chu *et al.* ayant travaillé avec une concentration dix fois plus faible. Nous pouvons également citer les travaux de Swarcewicz et Gregorczyk [2012], qui ont étudié l'influence de différents pesticides sur la dégradation de la pendiméthaline (herbicide) dans deux sols de texture différente (sableux et argileux). Les effets sont très similaires dans les deux sols : aucune influence sur la vitesse de disparition de la pendiméthaline ($T_{1/2} = 26,9$ jours) en présence de métribuzine (herbicide) ou de thiaméthoxame (insecticide) mais une inhibition significative avec le mancozèbe (fongicide) ($T_{1/2} = 46,1$ jours) et très forte avec le mélange (mancozèbe + thiaméthoxame) ($T_{1/2} = 62,2$ jours). Le mancozèbe pourrait détruire les champignons du sol et soit éliminer les microorganismes dégradants, soit perturber l'écosystème microbien global. Le même type d'effet avait été observé avec une persistance accrue du linuron en présence d'un fumigateur (Vorlex®) [Smith, 1982].

Il n'est donc pas facile de tirer des conclusions : il semble cependant qu'un effet inhibiteur soit le plus souvent décrit avec des phases de latence [Li *et al.*, 2008] et des temps de demie-vie plus longs, des taux de minéralisation moins importants [Karanth *et al.*, 1984] dans le cas de mélange par rapport au pesticide seul, entraînant une persistance plus longue des pesticides individuels. Joly *et al.* [2012] ont étudié l'effet de la combinaison de la mésotrione avec le S-métolachlore formulés sur leur biodégradation respective dans un sol de Limagne. S'il n'y a pas d'effet significatif sur le S-métolachlore, le mélange a fortement augmenté la persistance de la mésotrione, en particulier à 10 fois la dose agronomique (Figure 32).

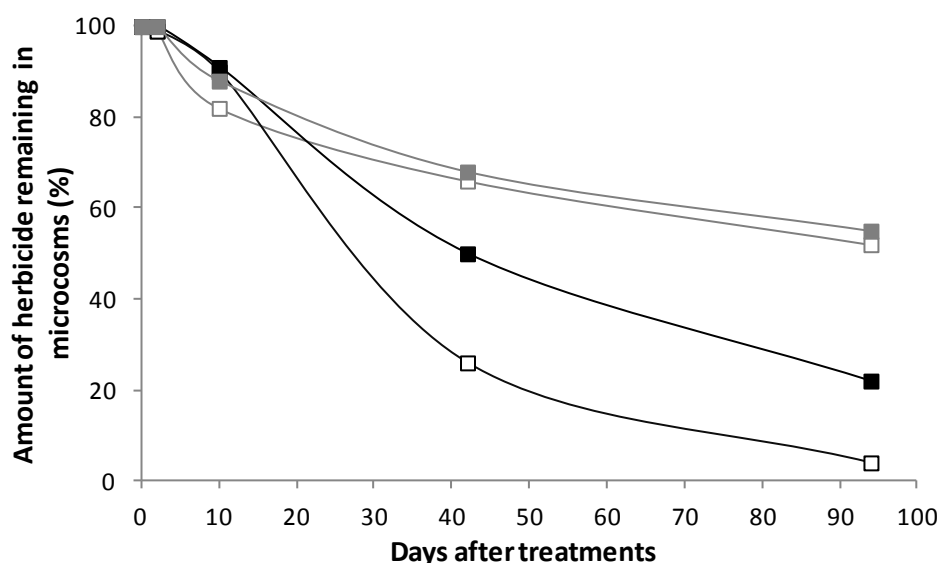


Figure 32: Dissipation de la mésotrione (en noir) et du S-métolachlore (en gris) appliqué à 10 × FR, seuls (symboles évidés) ou en «cocktail» (symboles pleins) dans des microcosmes de sol de Limagne (d'après Joly *et al.*, 2012)

Kaufman *et al.* [1970] avaient déjà montré une inhibition du métabolisme biodégradatif des phénylcarbammates en présence de méthylcarbammates dans les sols par un mécanisme compétitif vis-à-vis des hydrolases spécifiques. D'autres arguments ont été mis en avant pour expliquer cette diminution de la biodégradation de chaque pesticide du mélange : inhibition non compétitive pour un mélange atrazine et bentazone [Li *et al.*, 2008], toxicité accrue des deux pesticides en mélange ou apparition d'une toxicité liée à la formation de métabolites [Karanth *et al.*, 1984 ; Tejada, 2009]. Quelques exemples de mélange ternaires de pesticides ont conduit à des conclusions similaires. Krishna et Philip [2011], qui ont suivi la biodégradation de trois pesticides (lindane, méthyl parathion, et carbofurane) dans des réacteurs de sols submergés et aérés, ont observé une diminution du pourcentage de dégradation pour tous lorsqu'ils sont en mélange. Leur hypothèse est que cette baisse d'efficacité est liée au nombre moins important de microorganismes spécifiques pour la dégradation de chacun d'entre eux, donc une inhibition compétitive.

De nombreuses interactions peuvent donc exister, incluant l'impact d'un des pesticides (surtout dans le cas de fongicides) sur la composition et la taille de la communauté microbienne du sol, des effets sur des enzymes spécifiques inhibant des processus tels que la nitrification ou à des effets physico-chimiques comme la compétition pour des sites d'adsorption [Jafvert *et al.*, 1990 ; Xing *et al.*, 1996], rendant plus ou moins biodisponible

l'un ou l'autre des pesticides du mélange. Ce dernier point, qui peut être majeur en fonction des caractéristiques des sols et de la structure chimique de la molécule, a fait l'objet de quelques études spécifiques. En effet, il est connu que les processus d'adsorption gouvernent directement la mobilité ou le piégeage d'un pesticide, mais ils influent également sur la biodégradation en rendant le pesticide plus ou moins biodisponible. La toxicité directe des pesticides et/ou de leurs métabolites peut également être modulée par ces phénomènes. Martins et Mermoud [1998] ont plus particulièrement étudié les interactions entre adsorption et biodégradation sur quatre herbicides nitro-aromatiques. Ils ont montré une forte modification des isothermes d'adsorption de trois des quatre composés étudiés lorsqu'ils sont en mélange, qui deviennent non-linéaires avec une adsorption plus faible, sans doute à cause de l'effet de compétition pour les sites (Figure 33). Seul le 2,4-dinitrophénol (DNP) se comporte de manière similaire qu'il soit seul ou en mélange, ce qui suggère qu'il est le responsable principal de l'adsorption compétitive.

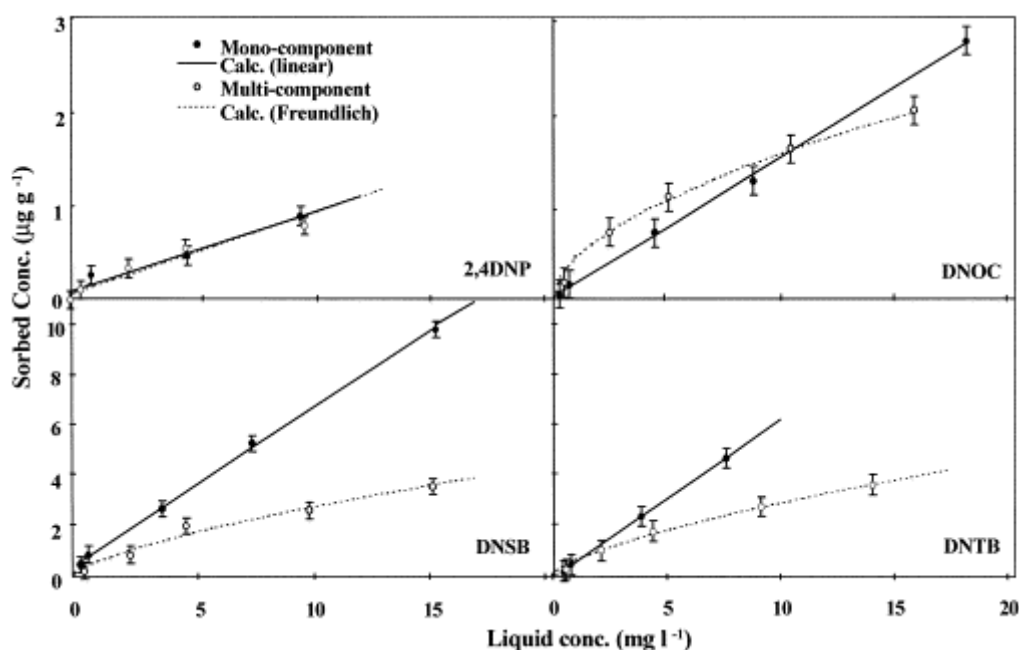


Figure 33 : Isothermes d'adsorption de quatre herbicides aromatiques nitrés, seuls ou en mélange sur des suspensions de sols alluviaux (rapport sol / solution = 1/2). 2,4DNP : 2,4-dinitrophénol, DNOC : 2-méthyl-4,6-dinitrophénol, DNSB : Dinoseb, DNTB : Dinoterb (d'après Martins et Mermoud, 1998)

Une augmentation des vitesses de biodégradation a également été observée dans le mélange, contrairement aux herbicides seuls, sauf pour le DNP. Ces résultats semblent confirmer le rôle primordial des processus d'adsorption, la plus faible immobilisation des pesticides dans ce mélange rendant ces molécules plus biodisponibles.

Une autre explication pour la modulation des cinétiques de biodégradation dans le cas de mélange est liée à la toxicité accrue de deux molécules par rapport à une seule.

II.4. Impact sur la toxicité vis-à-vis de différents organismes

Afin de prédire la réponse toxicologique d'un mélange de substances chimiques, deux approches différentes ont été développées: l'addition des concentrations (CA) et le modèle de l'action indépendante (IA) ou addition des réponses. Les deux modèles sont applicables respectivement sur des composés chimiques ayant le même mode d'action ou avec des modes d'action différents.

La première approche (CA) est basée sur l'idée que les composés d'un mélange ont un site d'action commun et qu'un composé peut servir de dilution aux autres, ce qui veut dire que l'effet peut être obtenu en remplaçant un composé chimique par un autre totalement ou partiellement par la même quantité d'un autre composé ayant la même efficacité/toxicité [Berenbaum, 1985]. Ainsi, les concentrations de toutes les substances toxiques peuvent être additionnées pour obtenir une valeur prédictive de la toxicité. Selon ce modèle, la concentration totale d'un mélange ayant un certain effet devrait être calculée selon l'équation suivante :

$$ECx_{mix} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{ECx_i} \right)^{-1}$$

où ECx_{mix} est la concentration totale du mélange qui provoque un effet x , P_i indique la proportion du composant i dans le mélange, et ECx_i indique la concentration du composant i ayant un effet x [Faust *et al.*, 2000 ; 2001].

La notion d'action indépendante (IA) a été développée par Bliss [1939]. Ce modèle suppose que les différentes substances provoquent un courant intégrant l'effet biologique (par exemple, la mort). Chaque substance agit de manière totalement indépendante dans l'organisme [Altenburger *et al.*, 2000]. Par conséquent, la réaction du mélange est calculée comme une combinaison d'effets et non pas en tant que somme des concentrations [Faust *et al.*, 2003; Backhaus *et al.*, 2004].

Cependant, ces modèles ne se sont pas toujours révélés en accord avec les données expérimentales obtenues, suivant le type de pesticides présent dans le mélange ou le

compartiment environnemental étudié. Par exemple, une étude menée avec des pesticides utilisés dans la préservation du bois par mesure des LC_{50} sur l'amphipode *Gammarus pulex* a montré qu'à des concentrations environnementales, les fongicides propiconazole et tébuconazole ne sont pas toxiques, le 3-iodo-2-propynyl-butylcarbamate (IPBC, fongicide) est modérément toxique, et la cyperméthrine (insecticide = pyréthroïde) est extrêmement toxique [Adam *et al.*, 2009]. Soumis à un mélange simulé d'une solution commerciale de ces quatre composés (18,2% de cyperméthrine, 45,8% de propiconazole, 17,2% de tébuconazole et 18,8% d'IPBC), la toxicité globale observée est équivalente à celle du composé le plus toxique (cyperméthrine) même si il est minoritaire dans le mélange. Les modèles CA et IA prédisent très bien les résultats obtenus. Par contre, lorsque ces organismes ont été soumis au véritable mélange commercial contenant ces mêmes pesticides mais aussi des solvants et des adjuvants, les effets toxiques étaient nettement plus élevés et plus du tout prévisibles par les modèles, ces derniers sous-estimant fortement la toxicité observée. Il est donc difficile de tout prendre en compte.

De nombreuses études toxicologiques ou d'impact des mélanges, très souvent binaires, ont été publiées, sur différents organismes isolés ou écosystèmes. Nous ne présenterons ici que quelques exemples dans diverses catégories en lien avec les pesticides étudiés lorsque c'est possible, les résultats obtenus étant dépendants des molécules, des conditions, de la façon d'appréhender la toxicité mais surtout de l'organisme testé.

Une grande enquête recensant les diverses activités en matière de santé humaine sur les mélanges de composés chimiques, au sens large, avait montré dès 1998, l'intérêt de prendre en compte la présence de multi-contaminants dans notre environnement [Feron *et al.*, 1998]. Des études plus ciblées sur les effets cytogénétiques, génotoxiques ou liés au développement, en particulier d'insecticides seuls ou en mélange, ont montré de possibles effets synergiques entre composés, conduisant par exemple à des taux d'anomalies chromosomiques chez le rat fortement augmentés [Karabay et Oguz, 2005 ; Scherholz de Castro et Chiorato, 2007].

La réponse est parfois liée à l'organisme testé mais dépend aussi de la structure chimique fine des pesticides mélangés. Ainsi, la toxicité de différents insecticides organophosphorés (chlorpyrifos, méthylparathion, diazinon) est fortement augmentée en présence d'atrazine à partir d'une concentration supérieure à 40 $\mu\text{g/L}$ chez *Hyaella azteca*

(amphipode d'eau douce) alors qu'aucune différence significative n'est observée chez *Musca domestica* (mouche domestique) [Anderson et Lydy, 2002], ni chez les macroinvertébrés décomposeurs de feuilles [Rasmussen *et al.*, 2012]. Le tébuconazole, lui, a doublé la toxicité de la cyhalothrine (insecticide) chez l'abeille (la toxicité du mélange étant plus grande que la somme des toxicités des deux pesticides seuls) mais n'a pas changé celle de l' α -cyperméthrine (insecticide de la même famille des pyréthroïdes) [Thompson et Wilkins, 2003]. La même absence d'effet sur la toxicité a été observée avec *Daphnia magna* pour le mélange tébuconazole + α -cyperméthrine alors qu'un effet synergique fort a été observé avec l'époxiconazole et le propiconazole, deux autres fongicides de la famille des triazoles [Norgaard et Cedergreen, 2010]. Les combinaisons de pesticides peuvent donc avoir parfois des effets très importants, mais qui ne sont pas forcément liés à la co-présence de deux pesticides. Relyea [2004] a comparé l'effet de différents mélanges binaires de pesticides sur la survie de différentes espèces d'amphibiens, avec ces mêmes pesticides seuls à une fois et deux fois la dose du mélange afin de vérifier que l'effet observé n'était pas lié à une exposition à une concentration deux fois plus forte de pesticides. Dans aucun des cas, il n'a observé une mortalité plus forte avec le mélange des pesticides qu'avec le doublement de la dose d'un pesticide seul.

Quelques études ont également porté sur l'impact de mélanges de pesticides sur les communautés microbiennes du sol, en étudiant différents paramètres : impact sur les différentes populations (bactéries, champignons...) [Chu *et al.*, 2008], sur certaines activités enzymatiques spécifiques (déshydrogenase, phosphatases, chitinase, arylsulfatase, ...) [Tejada, 2009 ; Saison *et al.*, 2009 ; Srinivasulu et Rangaswamy, 2013]. Les effets sont variables suivant le type de sol et le critère évalué et ne sont souvent que transitoires, visibles peu après l'épandage, un phénomène de résilience étant observé à plus long terme [Saison *et al.*, 2009] pouvant être lié à la biodégradation des pesticides [Tejada, 2009]. Les mélanges sont cependant plutôt plus toxiques que les pesticides seuls : c'est le cas : (i) pour le cocktail (glyphosate + diflufenican) sur la biomasse microbienne et donc sur les activités enzymatiques (déshydrogenase, uréase, β -glucosidase, phosphatase et arylsulfatase) [Tejada, 2009] ; (ii) pour le mélange (chlorpyrifos + chlorothalonil) sur les populations bactériennes, fongiques et d'actinomycètes avec des diminutions de 55, 79 et 86%, respectivement, un jour après l'addition, par rapport au contrôle contenant juste le chlorpyrifos. Cependant, dans certains cas, les activités enzymatiques du sol étudiées sont augmentées. Par exemple,

Srinivasulu et Rangaswamy [2013] ont noté une stimulation de l'activité myrosinase, enzyme qui hydrolyse les glucosinolates en D-glucose, et de l'activité arylamidase, impliquée dans la minéralisation de l'azote, en présence de mélange insecticide + fongicide (monocrotophos + mancozeb ou chlorpyrifos + carbendazime).

En conclusion, la présence de mélanges de composés chimiques, qu'ils s'agissent de différents pesticides épandus en cocktails ou d'une matière active avec ces additifs et adjuvants (formulations), peut fortement influencer sur le devenir et la toxicité d'un composé individuel en jouant sur différents processus : photodégradation, adsorptions compétitives rendant plus biodisponible un composé par rapport à un autre, inhibition ou toxicité vis-à-vis d'une enzyme dégradante ou jouant un rôle majeur dans le cycle de vie de l'écosystème donc influant sur la biodégradation... Les quelques études publiées montrent la complexité de l'étude de l'impact de ces mélanges sur leur biodégradation et leur toxicité. Il est cependant primordial de prendre en compte ces mélanges complexes produits par les systèmes de culture conventionnels et présents dans les eaux de surface, exutoires des agro-systèmes pour une évaluation des risques globaux des pesticides.

MATERIELS ET METHODES

Généralités

I. Composés chimiques

La mésotrione, ainsi que ses métabolites décrits dans la littérature (MNBA et AMBA) nous ont été gracieusement fournis par la société Syngenta Crop Protection. Le tébuconazole est commercialisé par Sigma-Aldrich (Pestanal®). Le Callisto® (formulation contenant la mésotrione à 100 g/L) et le Balmora® (formulation contenant le tébuconazole à 250 g/L) nous ont été donnés par J. Devedeux, Professeur d'Agronomie, au Lycée agricole Louis Pasteur (Site de Marmilhat, 63370 Lempdes). Le triméthylsilylpropionate de sodium tétradeutéié (TSPd₄), utilisé comme référence interne pour les analyses RMN, et le chloroforme deutéré CDCl₃, sont commercialisés par la société Eurisotop.

II. Conditions de culture et expériences de dissipation

II.1. Conditions de culture

Les souches bactériennes sont aliquotées (3 mL) et conservées à -80 °C en présence de 10 % de glycérol (agent cryoprotecteur). Un aliquot est décongelé puis utilisé pour ensemer 100 mL de milieu de culture (Trypcase Soja bioMérieux (TS)) dans un erlenmeyer de 500 mL. Cette préculture est agitée à 27°C et à 200 rpm pendant 24 h et 2 mL de préculture sont ensuite ajoutés à 100 mL du milieu de culture (TS). La culture est agitée à 200 rpm et à 27°C pendant 24 h (fin de phase exponentielle).

Remarque : Le milieu TS (Trypcase Soja bioMérieux) contient (pour 1 litre d'eau distillée):

- Bio-trypcase : 17 g
- Bio-soyase : 3 g
- Glucose : 2,5 g

- NaCl : 5g
- K₂HPO₄ : 2,5 g

II.2. Incubation en présence de pesticides

Après culture sur milieu TS, les cellules sont centrifugées à 8000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé deux fois avec (i) une solution de NaCl 0,8 % puis (ii) de l'eau de Volvic® (cette eau a été choisie pour sa composition physicochimique et son pH constants). Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans l'eau de Volvic (« resting cells ») et réparti dans des erlenmeyers de 500 mL en présence d'une solution de pesticide, à raison de 5 g de biomasse humide pour 100 mL de solution (sauf cas particuliers décrits ultérieurement). Les erlenmeyers sont ensuite placés sur une table d'agitation à 200 rpm et à 27°C. Des prélèvements de 1 mL sont effectués régulièrement pour suivre la cinétique de biodégradation. Ils sont centrifugés à 12500 rpm pendant 3 min. Le surnageant est congelé à -25°C jusqu'au moment des analyses HPLC et/ou RMN.

Des témoins abiotiques (solution de pesticides dans l'eau de Volvic) ont été également réalisés en parallèle dans les mêmes conditions pour contrôler la stabilité thermique, chimique et photochimique de ces composés.

Des témoins « cellules », contenant la suspension bactérienne dans l'eau de Volvic en absence de pesticides, sont systématiquement réalisés dans les mêmes conditions afin de suivre la formation de métabolites endogènes (propres aux cellules) pour chaque expérience.

III. Tests de toxicité des matières actives et des formulations sur la croissance de souches microbiennes

III.1. Souches testées

Les souches testées sont les souches bactériennes: *Bacillus* sp. 3B6, *Bacillus* sp. IB4 et IB11, *Bacillus* sp. 7B11, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17504, *Pseudomonas putida* ATCC 21244, *Escherichia coli* ATCC 11303 et la levure *Candida albicans* CIP 444.

III.2. Conditions de culture

Un aliquot (200 µL) de la souche microbienne à tester conservée à -80°C est décongelé pour ensemer 10 mL de milieu de culture PC dans un erlenmeyer de 50 mL. Cette préculture est agitée à 27°C et à 200 rpm pendant 24h.

Remarque : Le milieu PC utilisé contient (pour 1 litre d'eau distillée):

- Peptone : 5 g
- Extrait de levure 2,5 g
- Glucose : 1g

Ce milieu relativement pauvre est choisi pour limiter la croissance des souches testées.

III.3. Suivi de la croissance des différentes souches microbiennes

A 4,5 mL de milieu de culture PC placés dans des tubes stériles de 10 mL sont ajoutés 0,5 mL d'une solution de concentrations croissantes en pesticide pur ou formulé, seul ou en mélange (précisées ultérieurement) - stérilisée par filtration dans le cas des matières pures et ajoutée directement dans le cas des formulations - et 100 µL de suspension cellulaire (préculture préparée selon le protocole décrit précédemment). Chaque culture est réalisée en triplicat. Les tubes sont placés sur une table d'agitation à 200 rpm et à 27°C. Des lectures de densité optique (DO) sont faites toutes les heures à l'aide d'un spectrophotomètre ($\lambda = 600$ nm).

IV. Techniques d'analyse pour le contrôle des cinétiques de dissipation

IV.1. Analyses par HPLC

Les analyses par HPLC sont réalisées sur une chaîne Agilent 1100 munie d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD) et d'un détecteur à fluorescence, pilotée par le logiciel Chemstation. La colonne utilisée est une C-18 Zorbax Eclipse Plus (Agilent), 150 mm × 4,6 mm, 5 µm. Les éluants varient suivant le composé et seront précisés ultérieurement.

IV.2. Analyse par RMN ^1H

Les spectres sont enregistrés à 500,13 MHz sur un spectromètre Avance Bruker 500 à 25°C dans des tubes de 5 mm de diamètre. La sonde utilisée est une sonde inverse triple accord ^1H - ^{13}C - ^{15}N équipée d'une bobine de gradients de champs sur l'axe z. La présence importante d'eau dans les échantillons rend l'utilisation d'une séquence (présaturation) éliminant sa résonance obligatoire. La séquence utilise deux impulsions de phases opposées d'une durée de 3 s.

IV.3. Quantification par RMN ^1H

A 540 μL de surnageant, issus des échantillons centrifugés et congelés (**II-2**), sont ajoutés 60 μL d'une solution de TSPd₄ à 5 mM préparée dans D₂O. Le TSPd₄ (triméthylsilylpropionate de sodium tétradeutééré) est utilisé comme référence interne. Il sert à la calibration de l'échelle des déplacements chimiques et à la quantification des produits. Il apparaît sur le spectre sous forme d'un singulet résonnant à 0 ppm.

Les concentrations en pesticide [m] sont proportionnelles à la valeur d'intégration de chaque pic. D'après la formule suivante, en connaissant le nombre de protons qui correspond à chaque signal, on peut calculer la concentration [m] du pesticide et des métabolites identifiés :

$$[m] = \frac{9A_o [A_{\text{ref}}]}{b A_{\text{ref}}} \times \text{facteur de dilution du surnageant}$$

- [m] = concentration en xénobiotique m (mM)
- A_o est l'intégrale d'un signal du xénobiotique m
- [A_{ref}] est la concentration de TSPd₄ dans le tube RMN (0,5 mM)
- b est le nombre de protons correspondant au signal intégré du xénobiotique m
- A_{ref} est l'intégrale du TSPd₄
- Facteur de dilution du surnageant lorsqu'il est ajouté à la solution de TSPd₄ pour l'analyse RMN (1,1 dans notre cas)

Etude de la mésotrione et de sa formulation (Callisto®)

I. Préparation des solutions de mésotrione et Callisto®

I.1. Préparation des solutions de mésotrione

Dans une fiole jaugée de volume adéquat :

- Peser la quantité désirée de mésotrione
- Ajouter de l'eau distillée à une bonne moitié de la fiole environ
- Commencer à agiter avec un barreau aimanté
- Ajouter goutte à goutte une solution de NaOH (1 M) jusqu'à dissolution de la mésotrione (Agiter vigoureusement pendant 2-3 minutes avant de rajouter la goutte suivante). Le pH doit atteindre une valeur autour de 9-10 pour obtenir une dissolution.
- Mesurer le pH et ajuster celui-ci à $7,0 \pm 0,3$ avec une solution d'HCl 0,5 ou 0,1 mM
- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge

Par cette méthode, on peut obtenir des solutions de mésotrione jusqu'à 20 mM.

I.2. Préparation des solutions de Callisto®

Le Callisto® est une formulation contenant de la mésotrione à 100 g.L^{-1} . La solution est préparée dans une fiole jaugée de volume adéquat, par addition d'un volume donné de Callisto® dans de l'eau distillée (grosse moitié de fiole). La solution est ensuite mise à agiter vigoureusement tout en ajoutant du NaOH 1 mM jusqu'à homogénéisation. Le pH est alors aux alentours de 10. Le pH est ensuite ajusté à 7 en utilisant une solution de HCl 0,5 mM. La solution finale ajustée est ensuite agitée pendant quelques heures. Il faut noter que, avant ajustement, le pH de la solution de Callisto® est de 2,9 et celle de la mésotrione pure est de 3,4.

Le Callisto® étant un liquide visqueux, une vérification systématique par HPLC de la concentration en mésotrione de la solution avant utilisation est réalisée.

Des solutions de concentrations jusqu'à 10 mM en mésotrione sont préparées par cette méthode.

II. Souches dégradantes étudiées

Les souches étudiées pour la biodégradation de la mésotrione et du Callisto® sont issues soit :

1- d'un large criblage de souches réalisées lors d'un travail de thèse précédent par Stéphanie Durand [2007]. Quatre souches bactériennes, isolées d'eau de nuages prélevée au sommet du Puy de Dôme, (*Bacillus* sp. 3B6, *Bacillus* sp. 7B11, *Pantoea* sp. 12B5 et *Pseudomonas syringae* 12B8), avaient montré leur capacité à dégrader la mésotrione.

2- d'isolement à partir d'un sol noir de Limagne (jachère vierge de tout traitement phytosanitaire pendant les 15 ans précédant l'étude) par des techniques d'enrichissement par Isabelle Batisson (Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Université Blaise Pascal). Six souches bactériennes dégradant la mésotrione ont été isolées, toutes du genre *Bacillus*. Elles sont notées IB1, IB4, IB8, IB10, IB11 et IB13.

3- d'un nouveau test de souches bactériennes commerciales de notre souchothèque suite à des études bibliographiques. Une souche a été retenue : *Escherichia coli* ATCC 11303 [Pileggi *et al.*, 2012].

III. Incubation de la mésotrione et du Callisto avec les souches étudiées

Pour chacune des souches, l'incubation en présence de mésotrione ou de Callisto®, à différentes concentrations suivant les expériences, a été réalisée en regroupant 5 erlenmeyers de 100 mL de culture, préparés suivant la méthode générale décrite précédemment. Il a été vérifié que la DO ($\lambda = 575$ nm) après culture, et la biomasse humide après lavages (sauf pour *Bacillus* sp. 3B6 qui ne culotte pas), étaient similaires pour les différentes souches testées

(Tableau 3). Des étalements sur boîte de Pétri (TS) par dilutions successives pour dénombrer les cellules bactériennes ont également été réalisés pour l'ensemble des souches (Tableau 3).

Tableau 3 : Données concernant les cultures des souches étudiées

Souches testées	DO* ($\lambda = 575 \text{ nm}$)	Nombre de cellules/mL (après 24h de culture)	Biomasse humide** (g)
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	9,9	$1,0 \times 10^9$	---
<i>Bacillus</i> sp. IB1	9,2	$3,7 \times 10^8$	5,3
<i>Bacillus</i> sp. IB4	9,2	$6,0 \times 10^8$	5,4
<i>Bacillus</i> sp. IB8	9,5	$2 \sim 4 \times 10^8$	5,2
<i>Bacillus</i> sp. IB10	9,6	$4,0 \times 10^8$	5,1
<i>Bacillus</i> sp. IB11	9,6	$9,2 \times 10^8$	5,5
<i>Bacillus</i> sp. IB13	9,3	$8,6 \times 10^8$	5,3
<i>Bacillus</i> sp. 7B11	8,9	$1,2 \times 10^9$	5,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	9,8	$1,1 \times 10^9$	5,0
<i>Pantoae</i> sp. 12B5	8,8	$1,6 \times 10^{10}$	5,4
<i>Pseudomonas syringae</i> 12B8	9,5	-	5,2

* DO « moyenne » sur 3 à 10 expériences selon les souches; ** Obtenue après centrifugation et lavages de 500 mL de culture

Après lavages au NaCl 0,8% et à l'eau de Volvic®, le culot bactérien est repris, dans tous les cas, par 100 mL d'une solution de mésotriane à la concentration désirée. Des prélèvements sont faits régulièrement pendant 5 jours et sont congelés à -25°C jusqu'aux analyses.

IV. Comparaison de la biodégradation de la mésotrione pure par *E. coli* ATCC 11303 dans l'eau de Volvic et dans un milieu minéral

Nous avons cherché à comparer les cinétiques de biodégradation de la mésotrione par la souche *E. coli* ATCC 11303 dans l'eau de Volvic® (classique) et dans un milieu minimum. Pour ce faire, nous sommes partis de 500 mL de culture TS et avons préparé les cellules de la façon suivante :

- **Expérience classique** : cf. protocole général décrit précédemment (II.2.).
- **Expérience dans le milieu minimum** : Après centrifugation du milieu de culture et lavages au NaCl 0,8 % puis dans le milieu minimum, le culot bactérien est repris par 95 mL de milieu minimum et 5 mL d'une solution de mésotrione 20 mM, préparée dans l'eau distillée.

Des prélèvements sont effectués régulièrement pendant 5 jours et sont congelés à - 25°C jusqu'aux analyses par HPLC.

Remarque : Le milieu minéral minimum contient (pour 1 L d'eau distillée, pH = 7):

- K_2HPO_4 : 1,6 g
- KH_2PO_4 : 0,4 g
- $MgSO_4, 7H_2O$: 0,2 g
- NaCl : 0,1 g
- $CaCl_2$: 2 mg
- $FeSO_4$: 5 µg
- Acide borique : 2 mg
- $MnSO_4, H_2O$: 1,8 mg
- $ZnSO_4, H_2O$: 0,2 mg
- $CuSO_4, 5H_2O$: 0,8 mg
- Na_2MoO_4 : 0,25 mg
- $Co(NO_3)_2$: 0,1 mg
- Thiamine - HCl : 0,1 mg
- Biotine : 0,04 mg

V. Contrôle des cinétiques de dissipation de la mésotrione pure ou formulée

V.1. Analyses par HPLC

Les échantillons, après décongélation, sont systématiquement centrifugés une nouvelle fois à 12500 rpm pendant 3 minutes. Les analyses sont effectuées en mode gradient sur une colonne C-18 Zorbax Eclipse Plus (Agilent) en utilisant les conditions suivantes (Tableau 4):

Tableau 4 : Conditions d'analyse des cinétiques de biodégradation de la mésotrione par HPLC

	Mode gradient
Eluant	A = H₂O + 0,01 % H₃PO₄ (pH = 2,6) B = Acétonitrile 0-5 min : 95 % A 5-30 min : 95-5 % A linéaire 30-32 min 5-95% A 32-35 min 95 % A
Débit	1 ml/min
Température de la colonne	22°C
Longueur d'onde (DAD)	254 nm
Longueurs d'excitation et d'émission (FLD)	$\lambda_{\text{ex}} = 220 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$
Volume d'injection	5 μL
Temps de rétention (min)	Mésotrione : 20,0 Métabolite 2 : 13,5 Métabolite 3 : 16,5 Métabolite 4 : 13,7 AMBA : 10,2 (FLD)

V.2. Analyses par RMN ^1H

Les spectres ^1H sont enregistrés selon le protocole général décrit précédemment. Les cinétiques sont étudiées en utilisant 2 méthodes, Zgpr et Noesygppr1d. Les paramètres d'acquisitions de ces deux méthodes sont résumés dans le Tableau 5 :

Tableau 5 : Paramètres d'acquisition des spectres ^1H pour les cinétiques de dissipation de la mésotrione

	Zgpr	Noesygppr1d
Impulsion ^1H de 90°	8,5 μs	9,5 μs
Impulsion de saturation	3s	3s
Délai de relaxation	2 s	2 s
Durée d'acquisition	4,67 s	4,67 s
Nombre de points	45536	45536
Nombre de scans	128	128
Fenêtre spectrale	7003 Hz	7003 Hz
Nombre de scans factices	4	4
Durée de l'analyse	23 min	20 min

VI. Identification du métabolite inconnu formé lors de la biodégradation de la mésotrione par les souches *Bacillus* sp. IB1, *Bacillus* sp. IB11 et *E. coli* ATCC 11303

VI.1. Préparation de l'échantillon pour les analyses par RMN

Afin d'identifier le métabolite inconnu, un essai de biodégradation quantitatif a été réalisé avec la souche donnant la concentration maximale de ce composé : *Bacillus* sp. IB11.

VI.1.1. Biodégradation de la mésotrione par *Bacillus* sp. IB11

L'incubation de *Bacillus* sp. IB11 en présence de la mésotrione 1 mM a été réalisée en regroupant 5 erlenmeyers de 100 mL de culture préparés suivant le protocole général. Des prélèvements sont réalisés régulièrement chaque heure et les échantillons sont analysés immédiatement par RMN ^1H afin de suivre l'évolution de la concentration du métabolite inconnu correspondant aux signaux à 7,8 et 8,2 ppm. Après 23h d'incubation, la concentration du métabolite est au maximum (0,23 mM). L'incubation est arrêtée et le volume total de l'erlenmeyer est centrifugé. Le surnageant (90 mL) est récupéré et placé au congélateur à -40°C.

Une incubation similaire servant de témoin « cellules » a été réalisée en parallèle dans l'eau de Volvic, en absence de xénobiotique. Après 13 heures d'incubation, le volume total de l'erlenmeyer est centrifugé et le surnageant (96 mL) est congelé à -40 °C.

VI.1.2. Test de lyophilisation pour concentrer le métabolite inconnu

Un essai de lyophilisation d'un volume de 5 mL du surnageant est réalisé afin de concentrer le métabolite inconnu. Après lyophilisation pendant 24 heures, le produit est récupéré dans 600 μL de D_2O et transféré dans un tube afin d'être analysé par RMN ^1H . Le spectre montre la disparition des pics provenant du métabolite inconnu, ainsi que ceux correspondant au métabolite **M3**. Le métabolite inconnu semble donc être instable à la lyophilisation. Une autre méthode de concentration a donc été testée, l'évaporation douce sous vide par Speed-Vac.

VI.1.3. Concentration par évaporation sous vide avec un Speed Vac

Vingt mL de surnageant sont évaporés à froid sous vide en utilisant un Speed-Vac SPD111V (Thermo). L'échantillon n'est pas évaporé à sec et l'eau évaporée est remplacée au fur et à mesure par D_2O . 540 μL du surnageant concentré dans D_2O et 60 μL d'une solution de TSPd₄ à 5 mM dans D_2O sont placés dans un tube de RMN. Le spectre de RMN ^1H montre la présence de tous les pics observés dans les surnageants avant traitement. L'ensemble des

métabolites est donc stable avec cette méthode. Une série d'expériences RMN 2D a ensuite été réalisée pour identifier le métabolite inconnu.

VI.2. Analyses par RMN 2D

VI.2.1 Expérience COSY ^1H - ^1H (Correlation Spectroscopy)

Cette séquence 2D homonucléaire permet de corréler les signaux de protons couplés scalairement. En d'autres termes, elle permet de transférer la magnétisation d'un proton sur un proton voisin et permet donc de visualiser les constantes de couplage 3J entre deux protons voisins. Le Tableau 6 résume les paramètres d'acquisition utilisés pour la réalisation d'une COSY.

Tableau 6: Paramètres d'acquisition d'une COSY

Nombre de scans	32
Nombre d'expériences TD1	1024
Nombre d'expériences TD2	2048
Durée d'acquisition	1 s
Pulse ^1H de 90°	0,2 s
Fenêtres spectrales	F1 = F2 = 5500 Hz (10 ppm)

VI.2.2 Expérience TOCSY ^1H - ^1H (Total Correlation Spectroscopy)

Cette séquence 2D homonucléaire permet de corréler les signaux de protons couplés scalairement ($^nJ_{\text{H}-\text{H}}$ avec $n \geq 3$) et de définir les différents ^1H d'un même système de spins. Cette méthode permet d'observer les couplages protons longue distance. Le Tableau 7 résume les paramètres d'acquisition utilisés pour la réalisation d'une TOCSY.

Tableau 7 : Paramètres d'acquisition d'une TOCSY

Nombre de scans	32
Nombre d'expériences TD1	1024
Nombre d'expériences TD2	2048
Durée d'acquisition	1 s
Pulse ^1H de 90°	0,2 s
Durée du spin-lock	70 ms
Fenêtres spectrales	F1= 5000 Hz, F2 = 5500 Hz

VI.2.3 Expérience NOESY ^1H - ^1H (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Cette séquence permet de corréler des protons par interaction dipolaire entre deux spins géométriquement proches (effet Overhauser nucléaire ou eOn). Les deux protons sont séparés par un grand nombre de liaisons mais proches spatialement. Notons que les corrélations ne sont plus visibles au delà de 5\AA . Le Tableau 8 résume les paramètres d'acquisition utilisés pour la réalisation d'une NOESY.

Tableau 8 : Paramètres d'acquisition d'une NOESY

Nombre de scans	32
Nombre d'expériences TD1	512
Nombre d'expériences TD2	2048
Durée d'acquisition	2 s
Pulse ^1H de 90°	0,2 s
Fenêtres spectrales	F1 = F2 = 5500 Hz

VI.2.4. Expérience HMQC ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multi-Quantum Correlation)

Cette expérience permet de corréler chaque proton avec le carbone auquel il est lié (constante de couplage $^1J_{\text{H,C}}$). La constante de couplage est de l'ordre de 135 et 160 Hz pour

les carbones aliphatiques et aromatiques, respectivement. Le tableau 9 résume les paramètres d'acquisition utilisés pour la réalisation d'une HMQC ^1H - ^{13}C .

Tableau 9 : Paramètres d'acquisition d'une HMQC ^1H - ^{13}C

Nombre de scans	32
Nombre d'expériences TD1	1024
Nombre d'expériences TD2	2048
Durée d'acquisition	1,5 s
Pulse ^1H de 90°	0,2 s
Fenêtres spectrales	F1= 20000 Hz, F2 = 5500 Hz

VI.2.5 Expérience HMBC (Multiple-Bond Correlation)

Cette expérience permet d'obtenir les corrélations et les couplages ($^3J_{\text{H,P}} \sim ^3J_{\text{H,C}} \sim 8 \text{ Hz}$) entre un proton et l'hétéroatome voisin. Le Tableau 10 résume les paramètres d'acquisition utilisés pour la réalisation d'une HMBC ^1H - ^{13}C .

Tableau 10: Paramètres d'acquisition d'une HMBC ^1H - ^{13}C

Nombre de scans	32
Nombre d'expériences TD1	1024
Nombre d'expériences TD2	2048
Durée d'acquisition	1,5 s
Pulse ^1H de 90°	0,2 s
Fenêtres spectrales	F1 = 30000 Hz, F2 = 5500 Hz

VI.3. Analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

La chaîne HPLC est un appareil Waters Alliance 2695 muni d'un détecteur à barrettes de diodes couplé à un spectrophotomètre de masse Waters (Micromass) QTOF, équipé d'une source électrospray (ESI), interface Z-spray. Les analyses ont été faites en mode positif.

La colonne HPLC utilisée est une colonne C18 Kinetex (Phenomenex), 2,1 x 100 mm, 2,6 μm et les conditions chromatographiques sont précisées dans le Tableau 11. Après dilution dans un mélange eau – acétonitrile (50-50 V/V) et séparation en chromatographie liquide, l'échantillon est introduit dans la source *via* un capillaire métallique. Sous l'action du gaz nébuliseur chauffé à 100°C (azote, 35 L/h) et d'un champ électrique appliqué entre le capillaire et une contre-électrode (3 kV), un spray de gouttelettes chargées est formé. Ce dernier perd par la suite les molécules de solvant grâce à un gaz de désolvatation (N_2 , chauffé à 180°C) avec un débit de 350 L/h. Des expériences en spectroscopie de masse de tandem (MS/MS) sont aussi réalisées en utilisant l'azote dans la cellule de collision avec un gradient d'énergie de 20 à 30 eV. Une calibration est réalisée avant de débiter les analyses en LC/MS avec de l'acide ortho-phosphorique (3 $\mu\text{L}/\text{min}$). Les conditions d'analyse sont résumées dans la Tableau 11.

Tableau 11 : Conditions d'analyse des cinétiques de dissipation de la mésotrione par LC-MS

	Mode gradient
Eluants	A = H_2O + 0,01 % HCOOH (pH = 2,9) B = Acétonitrile 0-15 min : 95 % A 15-25 min : 5 % A linéaire 25-35 min : 95 % A
Débit	0,2 mL/min
Température de la colonne	35°C
Longueur d'onde	200 - 400 nm (UV)
Volume d'injection	10 μL

Etude du tébuconazole et de sa formulation (Balmora®)

I. Préparation des solutions de tébuconazole et de Balmora®

I.1. Préparation des solutions de tébuconazole

Du fait de sa faible solubilité dans l'eau (36 mg/L à 25°C et pH 7 ; 30 mg/L à 20°C et pH 7 soit environ 100 µM), la préparation des solutions de tébuconazole a été réalisée de deux manières différentes suivant la concentration désirée. Les solutions de concentrations ≤ 75 µM sont préparées dans l'eau distillée tandis que celles > 75 µM sont préparées dans l'éthanol (avant dilution dans l'eau).

I.1.1 Préparation des solutions de tébuconazole dans l'eau

Dans une fiole jaugée de volume adéquat :

- Peser la quantité désirée du tébuconazole
- Ajouter de l'eau distillée à une bonne moitié de la fiole environ
- Agiter avec un barreau aimanté
- Ajouter petit à petit l'eau distillée jusqu'au trait de jauge
- Laisser en agitation une nuit (plus de 15 heures), la solubilisation du tébuconazole étant lente.

Notons que le pH des solutions préparées est aux alentours de 6,7.

I.1.2 Préparation des solutions de tébuconazole dans l'éthanol

Dans un tube eppendorf de 1,5 mL :

- Peser la quantité désirée du tébuconazole
- Ajouter 1 mL d'éthanol
- Vortexer pendant quelques secondes.

I.2. Préparation des solutions de Balmora®

Le Balmora® est une formulation contenant du tébuconazole à 250 g.L⁻¹. La solution est préparée dans une fiole jaugée de volume adéquat, par addition d'un volume donné de Balmora® dans l'eau distillée. La solution est ensuite mise à agiter vigoureusement pendant une nuit. Le pH final est toujours proche de 7. Une vérification systématique par HPLC de la concentration en tébuconazole de la solution avant utilisation est réalisée.

II. Criblage de souches dégradantes

Les microorganismes testés ont été cultivés sur milieu nutritif spécifique (100 mL) dans des erlenmeyers de 500 mL à 17°C ou 27°C suivant l'origine du microorganisme, sous agitation à 200 rpm. Tous les milieux d'ensemencement ont été préalablement stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 20 min sous une pression additionnelle de 1 bar. L'ensemencement s'effectue sous hotte à flux laminaire à l'aide d'une préculture cultivée dans les mêmes conditions. Les conditions précises de culture pour chaque microorganisme sont données dans le Tableau 12 :

Tableau 12 : Souches testées pour la biodégradation du tébuconazole

SOUCHES	CULTURE			SOUCHES	CULTURE		
	T (°C)	Milieu	Temps		T (°C)	Milieu	Temps
<i>Arthrobacter</i> sp. 7B9	27	TS	24h	<i>Geotrichum candidum</i> CBS14488	27	Milieu 200	24h
<i>Arthrobacter</i> sp. N4	27	TS	24h	<i>Janthinobacterium</i> sp. 2B18	17	TS	24h
<i>Arthrobacter</i> sp. SR30	27	TS	24h	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> 2B3	17	TS	24h
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	27	Rosazza	24h	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i> RP1	27	TS	24h
<i>Aureobasidium pullulans</i> G	27	Sabouraud	76h	<i>Nocardia asteroides</i> LAB911	27	TS	24h
<i>Bacillus cereus</i> 2B9	27	TS	24h	<i>Nocardia rubra</i> ATCC15906	27	TS	24h
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	27	TS	24h	<i>Pantoea</i> sp. 12B5	27	TS	24h
<i>Bacillus megaterium</i> DSM32	27	TS	24h	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145	27	TS	24h
<i>Bacillus pumillus</i> 5B1	17, 27	TS	24h	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP69B	27	TS	24h
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	27	TS	24h	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC21244	27	TS	24h
<i>Bacillus</i> sp. 29B3	27	TS	24h	<i>Pseudomonas putida</i> DSM84	27	TS	24h
<i>Bacillus</i> sp. IB1	27	TS	24h	<i>Pseudomonas</i> sp. 14B10	27	TS	24h
<i>Bacillus</i> sp. IB4	27	TS	24h	<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	27	TS	14h
<i>Bacillus</i> sp. IB8	27	TS	24h	<i>Pseudomonas</i> sp. C12B ATCC43648	27	TS	24h
<i>Bacillus</i> sp. IB10	27	TS	24h	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> IB78	27	TS	24h
<i>Bacillus</i> sp. IB11	27	TS	24h	<i>Pseudomonas syringae</i> 12B8	27	TS	24h
<i>Bacillus</i> sp. IB13	27	TS	24h	<i>Rhodococcus erythropolis</i> BTS1	27	TS	24h
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	27	TS	24h	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> OBT18	27	TS	24h
<i>Burkholderia</i> sp. 1B1	27	TS	24h	<i>Rhodococcus</i> sp. PA	27	TS	24h
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 2046	27	Sabouraud	24h	<i>Sphingomonas</i> sp. 7B15	17	R2A	48h
<i>Chelatobacter heinzii</i> SR45	27	TS	24h	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IB93	27	TS	24h
<i>Cryptococcus</i> sp. 28B7	17	Milieu 200	24h	<i>Streptomyces</i> sp. 1S1	27	E	60h
<i>Cryptococcus victoriae</i> 28B3	17	Milieu 200	24h	<i>Streptomyces</i> sp. 5S4	27	E	60h
<i>Diozegia crocea</i> 28B1	17	Milieu 200	24h	<i>Streptomyces</i> sp. 5S10b	27	E	60h
<i>Escherichia coli</i> ATCC11303	27	TS	24h				

La composition des différents milieux de culture est la suivante pour 1 L d'eau distillée :

- Milieu TS (Trypcase-Soja, bioMérieux) : Bio-Trypcase 17 g ; Bio-Soyase 3 g ; glucose : 2,5g ; NaCl 5 g ; K₂HPO₄ 2,5 g .
- Milieu R2A : Extrait de levure (Difco) 0,5 g ; protéose peptone n°3 (Difco) 0,5 g ; casaminoacides (Difco) 0,5 g ; glucose 0,5 g ; amidon soluble (Difco) 0,5 g ; pyruvate de sodium 0,3 g ; K₂HPO₄ 0,3 g et MgSO₄.7H₂O 0,5 g.
- Milieu Emerson (E) : Amidon soluble (Difco) 15 g ; extrait de levure (Difco) 2,5 g ; K₂HPO₄ 1 g et MgSO₄.7H₂O 0,5 g.

- Milieu Rosazza : Extrait de levure (Difco) 5 g ; soyooptim (Roquette) 5 g ; glucose 20 g ; NaCl 5 g et K₂HPO₄ 5 g.
- Milieu Sabouraud : Peptone 10 g ; glucose 20 g
- Milieu 200 : Extrait de levure (Difco) 3 g ; extrait de malt 3 g ; peptone 5 g ; glucose 10 g.

Après culture et préparation des cellules selon le protocole général précédemment décrit, l'incubation en présence de xénobiotique se fait à raison de 5 g de biomasse humide pour 100 mL d'une solution de tébuconazole à 0,1 mM préalablement préparée dans l'eau distillée (pH = 7,0).

III. Incubation du tébuconazole avec les souches dégradantes

Les souches bactériennes étudiées ont été sélectionnées suite au criblage précédent comme capables de dégrader efficacement le tébuconazole et proviennent soit :

- 1- d'isolement à partir d'eau de nuages collectée au sommet Puy de Dôme: *Bacillus* sp. 3B6 ;
- 2- de la banque de souches commerciales American Type Culture Collection (ATCC) : *Pseudomonas putida* ATCC 21244 et *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648.

III.1. Suivi cinétique de la dissipation du tébuconazole pur ou formulé

Pour chacune des souches, l'incubation en présence du tébuconazole ou de Balmora®, à différentes concentrations (de 1 à 100 µM pour la matière active), a été réalisée en regroupant 2 ou 4 erlenmeyers de 100 mL de culture, préparés suivant la méthode générale décrite précédemment. Après centrifugation à 8000 rpm pendant 15 minutes, le culot bactérien est lavé une fois avec du NaCl 0,8 %, puis avec de l'eau de Volvic. Il est ensuite repris dans 100 mL d'une solution de tébuconazole dans l'eau distillée. Des prélèvements sont effectués régulièrement pendant 5 jours et sont congelés à -25°C jusqu'aux analyses par HPLC.

III.2. Comparaison des cinétiques de biodégradation du tébuconazole pur par *Bacillus* sp. 3B6 dans l'eau de Volvic et dans un milieu minéral contenant une source d'azote

Nous avons cherché à comparer les cinétiques de biodégradation du tébuconazole par la souche *Bacillus* sp. 3B6 dans l'eau de Volvic® (classique) et dans un milieu minéral contenant une source d'azote. Pour ce faire, nous sommes partis de 200 mL de culture TS et avons préparés les cellules de la façon suivante :

- **Expérience classique** : cf. protocole décrit précédemment (II.2.)
- **Expérience dans le milieu minéral** : Après centrifugation du milieu de culture et lavages au NaCl 0,8 % puis dans le milieu minéral, le culot bactérien est repris par 90 mL de milieu minéral et 10 mL d'une solution de tébuconazole 100µM, préparée dans l'eau distillée.

Des prélèvements sont faits régulièrement pendant 3 jours et sont congelés à - 25°C jusqu'aux analyses par HPLC.

Remarque : Le milieu minéral utilisé contient (pour 1 L d'eau distillée, pH = 7):

- K₂HPO₄ : 1,6 g
- KH₂PO₄ : 0,4 g
- MgSO₄.7H₂O : 0,2 g
- NaCl : 0,1 g
- CaCl₂ : 2 mg
- (NH₄)SO₄ : 0,1 g

III.3. Suivi de l'énantiosélectivité de la biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6

L'énantiosélectivité de la biodégradation a été suivie sur deux expériences avec un protocole différent :

1^{er} protocole : des échantillons (1,5 mL) sont prélevés régulièrement au cours d'une expérience classique en erlenmeyer de biodégradation du tébuconazole 70 µM par *Bacillus* sp. 3B6 (à partir de 200 mL de culture). Après centrifugation à 10 000 rpm pendant 3 minutes, 1 mL de surnageant est placé dans un eppendorf de 2 mL et extrait avec 500 µL d'acétate

d'éthyle. Après agitation sur un Vortex et décantation, la phase organique est récupérée et l'extraction est renouvelée une deuxième fois. Les phases organiques sont combinées et séchées avec du MgSO_4 . Elles sont ensuite récupérées à l'aide d'une pipette Pasteur, placées dans un autre eppendorf et évaporées à sec sous courant d'azote. Le résidu est repris par 500 μL d'éluant HPLC avant analyse.

2^{ème} protocole : Un essai quantitatif à partir de 4 L de culture a été réalisé dans un fermenteur (Biolafitte) pour pouvoir travailler sur de plus gros volumes en termes d'extraction. Après centrifugation et lavages des cellules selon le protocole général, le culot bactérien est repris par 200 mL d'eau de Volvic® auquel on ajoute 600 mL d'une solution de tébuconazole 100 μM . L'ensemble est mis à incuber à 27°C sous agitation continue et une aération de ~ 1 v/v/m. Des prélèvements sont régulièrement effectués pendant 3 jours d'incubation. A chaque temps sont prélevés 2 fois 6 mL pour la détermination de l'excès énantiomérique du tébuconazole dans le surnageant (duplicat) et 1 mL pour le suivi cinétique de la biodégradation.

Le prélèvement de 6 mL, placé dans un tube Falcon de 15 mL, est extrait avec 3 mL d'acétate d'éthyle (agitation manuelle vigoureuse et Vortex pendant 1 minute). Des essais préliminaires sur des solutions pures de tébuconazole à différentes concentrations ont permis de vérifier que dans ces conditions, 100 % du tébuconazole était retrouvé dans la phase organique lors de cette unique extraction. La phase organique (1 mL) est récupérée, placée dans un eppendorf, séchée avec du MgSO_4 et évaporée sous courant d'azote. Le résidu est repris par 300 μL d'éluant HPLC avant analyses.

Dans les deux cas, les analyses sont réalisées à l'aide d'une colonne HPLC chirale CHIRALCEL OD-H (0,46 x 25 cm) sur un appareil Agilent 1100 munie d'un UV, pilotée par le logiciel Chemstation. La méthode analytique est la suivante : Mode isocratique ; Eluant ; Hexane/isopropanol 90/10 ; Débit : 0,6 mL/min ; $\lambda = 227$ nm ; Volume d'injection : 50 μL . Les temps de rétention des deux énantiomères du tébuconazole sont 38,7 et 43,4 min.

III.4. Suivi cinétique de la dissipation du tébuconazole : Extraction du culot bactérien

Nous avons observé que les concentrations initiales en tébuconazole retrouvées dans le surnageant étaient inférieures à celles attendues, en particulier avec la souche *Bacillus* sp. 3B6. Nous avons donc réalisé, en plusieurs points de la cinétique, une extraction du culot bactérien par du méthanol lors des incubations de *Bacillus* sp. 3B6 et *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648 en présence de tébuconazole 50 μ M.

Après culture et préparation du culot bactérien selon le protocole expérimental général (à partir de 2 ou 4 erlenmeyers de culture), il est repris dans 60 mL d'eau de Volvic et séparé en 4 parties homogènes de 12 mL dans 4 erlenmeyers de 100 mL. La solution de tébuconazole est ajoutée dans chaque erlenmeyer pour obtenir un volume final de 25 mL et une concentration de 50 μ M. Ces erlenmeyers sont mis à incubation (27°C et 200 rpm). A T₀ et à 3 autres temps d'incubation (7 heures, 23 heures et 75 heures), le contenu total de l'erlenmeyer est centrifugé (15 minutes, 8000 rpm, 4°C). Le surnageant est récupéré et congelé. Le culot est mis à agiter vigoureusement avec 10 mL de méthanol dans un erlenmeyer fermé, pendant une nuit à température ambiante. Après centrifugation, le surnageant récupéré est congelé. L'extraction est renouvelée une deuxième fois. Le surnageant et les extraits méthanoliques sont ensuite analysés par HPLC.

Remarque : La souche *Bacillus* sp. 3B6 culotte très difficilement. La récupération du surnageant nécessite plusieurs centrifugations à grande vitesse (10 000 rpm).

IV. Contrôle des cinétiques de dissipation du tébuconazole pur ou formulé par HPLC

Les échantillons, après décongélation, sont systématiquement centrifugés une nouvelle fois à 12500 rpm pendant 3 minutes. Les analyses sont effectuées sur une colonne phase inverse C18 Zorbax Plus (Agilent) en mode isocratique ou gradient (suivant ce qui est recherché) selon les conditions suivantes (Tableau 13) :

Tableau 13 : Conditions d'analyse des cinétiques de biodégradation du tébuconazole par HPLC

	Mode gradient	Mode isocratique
Eluants	A = H₂O + 0,01 % H₃PO₄ (pH = 2,6) B = Acétonitrile 0-5 min : 95 % A 5-30 min : 95-5 % A linéaire 30-32 min 5-95% A 32-35 min 95 % A	A = H₂O + 0,01 % H₃PO₄ B = Acétonitrile 50% de A et 50 % de B
Débit	1 mL/min	1 mL/min
Température de la colonne	25 °C	25 °C
Longueur d'onde	225 nm	225 nm
Volume d'injection	100 µL	100 µL
Temps de rétention (min)	Tébuconazole : 26,1 Métabolite M1 : 22,3 Métabolite M2 : 24,5	Tébuconazole : 6,7 Métabolite M1 : 4,2 Métabolite M2 : 5,4

V. Identification des métabolites formés lors de la biodégradation du tébuconazole

V.1. Essai quantitatif : Incubation du tébuconazole avec les souches dégradantes

Afin d'obtenir une grande quantité de métabolites, nous avons réalisé des essais quantitatifs d'incubation de chaque souche en présence de tébuconazole en partant de gros volumes de culture. La biodégradation est alors effectuée dans un fermenteur (BiolaFitte). Pour les souches, *Pseudomonas putida* ATCC 21244 et *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648, nous avons utilisé 50 erlenmeyers de 100 mL de culture (5L de culture), préparés suivant la méthode générale décrite précédemment. La totalité du culot bactérien est transférée dans 1,5 litre d'une solution de tébuconazole 100 µM dans un fermenteur de 2L sous agitation continue à une température de 27°C, aération ~ 0,7 v/v/m. Pour la souche

Bacillus sp. 3B6, 40 erlenmeyers de culture ont été utilisés (soit 4 L de culture) et le culot bactérien, obtenu après centrifugation et lavages, a été repris dans 1,5 L de solution de tébuconazole de concentration finale 50 μ M, cette souche ayant plus de mal à culotter et une dilution par l'eau résiduelle de lavage ne pouvant être empêchée. La biodégradation a été réalisée en fermenteur dans les mêmes conditions. Un témoin cellules a été réalisé en parallèle pour chaque souche dans les mêmes conditions avec un rapport cellules/volume d'eau de Volvic identique afin d'éliminer les signaux correspondants aux métabolites endogènes.

Dans chaque cas, les cinétiques de dissipation du tébuconazole sont suivies en direct par HPLC. Quand la biodégradation est terminée (23h, 32h et 30h pour *P. putida* ATCC 21244, *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648 et *Bacillus* sp. 3B6, respectivement), l'incubation est stoppée par centrifugation du volume total (8000 rpm pendant 15 minutes à 4°C).

Une partie du surnageant (20 mL) est soit directement analysée par HPLC/MS, soit directement évaporée en utilisant le speed-vac sans chauffage. L'eau résiduelle est remplacée par du D₂O. Après ajout de TSPd₄, le résidu est analysé par RMN ¹H. Le reste du surnageant est placé, par volume de 200 mL, dans une ampoule à décanter d'un litre et extrait avec 3 volumes de chloroforme (solubilité 50 g/L contre 38 μ g/L dans l'eau). L'extraction est répétée trois fois pour assurer le passage total du tébuconazole et/ou des métabolites dans la phase organique. L'ensemble des phases organiques est séché avec du MgSO₄, filtré sur papier Whatman et évaporé sous vide (rotavapeur). Le résidu est repris dans du chloroforme deutéré CDCl₃ (1 mL) pour être analysé par RMN ¹H. Le même protocole est appliqué aux témoins « cellules » pour chaque souche.

V.2. Analyses par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

Les analyses sont réalisées sur un appareil HPLC Agilent 1200SL, équipé d'une colonne phase inverse Zorbax Eclipse Plus XDB-C18 (10 cm x 2,1 mm ; taille des particules 3,5 μ m), couplé avec un spectromètre de masse Bruker ESI-TOF. La méthode HPLC utilisée est la suivante (Tableau 14) :

Tableau 14 : Conditions d'analyse des cinétiques de biodégradation du tébuconazole par LC-MS

	Mode gradient
Eluants	A = H₂O + 0,01 % HCOOH (pH = 2,9) B = Acétonitrile 0-1 min : 100 – 98 % A 1-8 min : 98-30 % A linéaire 8-10 min 30-0 % A 10-13 min 0-100 % A
Débit	0,5 mL/min
Température de la colonne	35°C
Longueur d'onde	225 nm
Volume d'injection	10 µL
Temps de rétention (min)	Tébuconazole : 8

V.3. Analyses par RMN 1D

V.3.1 RMN ¹H

Les spectres ¹H sont enregistrés dans l'eau ou dans le méthanol selon le protocole général décrit précédemment.

Pour les échantillons aqueux, 60 µL d'une solution de TSPd₄ à 5 mM dans D₂O sont ajoutés à 540 µL de surnageant des échantillons après décongélation et centrifugation. Les paramètres d'acquisition sont les suivants (Tableau 15) :

Tableau 15 : Paramètres d'acquisition des spectres ^1H pour l'étude de la biodégradation du tébuconazole (D_2O)

Impulsion ^1H de 90°	8,5 μs
Impulsion de saturation	3s
Délai de relaxation	2 s
Durée d'acquisition	4,67 s
Nombre de points	45536
Nombre de scans	128
Fenêtre spectrale	7003 Hz
Nombre de scans factices	4
Durée de l'analyse	23 min

Pour les extraits chloroformiques, les paramètres d'acquisitions des spectres de RMN ^1H du tébuconazole sont les suivants (Tableau 16) :

Tableau 16 : Paramètres d'acquisition des spectres ^1H pour l'étude de la biodégradation du tébuconazole (CD_3Cl)

Impulsion ^1H de 90°	8,4 μs
Impulsion de saturation	2s
Délai de relaxation	2 s
Durée d'acquisition	3,28 s
Nombre de points	65536
Nombre de scans	60
Fenêtre spectrale	6009 Hz
Nombre de scans factices	0
Durée de l'analyse	10 min

V.3.2 RMN ^{13}C

Les spectres ^{13}C sont enregistrés en utilisant les paramètres suivants (Tableau 17) :

Tableau 17 : Paramètres d'acquisition des spectres C^{13} J-MOD pour l'étude de la dissipation du tébuconazole

Impulsion ^{13}C	9,4 μs
Constante de couplage	145 Hz
Délai de relaxation	5 s
Durée d'acquisition	1,08 s
Nombre de points	65536
Nombre de scans	1024
Fenêtre spectrale	30000 Hz
Nombre de scans factices	0
Durée de l'analyse	1h 44 min

V.4. Analyses par RMN 2D

Les expériences de RMN 2D sont réalisées dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'identification du métabolite inconnu de la mésotrione. Elles ne seront pas re-détaillées ici (cf. partie **VI-2** du chapitre sur la mésotrione).

Etude du mélange de pesticides purs ou formulés

I. Choix des souches testées

Les souches testées pour l'étude de la biodégradation du mélange de pesticides, purs ou formulés, sont les souches bactériennes : *Bacillus* sp. 3B6, capable de dégrader les deux pesticides étudiés, et *Pseudomonas putida* ATCC 21244, capable de dégrader uniquement le tébuconazole.

II. Incubation de la mésotrione et du tébuconazole, purs ou formulés, avec la souche *Bacillus* sp. 3B6

Cette expérience permet de comparer la biodégradation de chaque pesticide seul avec celle effectuée en présence du mélange. L'incubation en présence de mésotrione et de tébuconazole, sous forme pure ou formulée, pour la souche *Bacillus* sp. 3B6 a été réalisée avec 200 ou 500 mL de culture préparés suivant la méthode générale décrite précédemment. Deux types d'expériences sont réalisés : mésotrione et tébuconazole purs d'une part et Callisto® et Balmora® d'autre part, à différentes concentrations. Des témoins classiques de biodégradation de chaque composé seul sont réalisés en parallèle dans les mêmes conditions afin de comparer les cinétiques de biodégradation. Le volume final est de 100 mL. Des prélèvements sont effectués régulièrement pendant 5 jours. Les échantillons sont congelés jusqu'aux analyses par HPLC des deux pesticides.

III. Incubation de la mésotrione et du tébuconazole, purs ou formulés, avec la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244

Le protocole expérimental est le même que précédemment, en partant de 200 mL de culture de *Pseudomonas putida* ATCC 21244.

IV. Contrôle des cinétiques de dissipation du mélange (mésotrione et tébuconazole) par HPLC

Les analyses sont effectuées sur une colonne phase inverse C18 Zorbax Eclipse Plus (Agilent) en mode gradient en utilisant les conditions précisées dans le Tableau 18 :

Tableau 18 : Conditions d'analyse des cinétiques de dissipation du mélange (mésotrione et tébuconazole) par HPLC

	Mode gradient
Eluants	A = H₂O + 0,01 % H₃ PO₄ (pH = 2,6) B = Acétonitrile 0-5 min : 95 % A 5-30 min : 95-5 % A linéaire 30-32 min : 5-95% A 32-35 min : 95 % A
Débit	1 mL/min
Température de la colonne	22°C
Longueur d'onde	$\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 225 \text{ nm}$
Longueurs d'excitation et d'émission (FLD)	$\lambda_{\text{ex}} = 220 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 430 \text{ nm}$
Volume d'injection	10 μL
Temps de rétention (min)	Mésotrione : 20 M2 (méso) : 13,2 M3 (méso) : 15,7 M4 (méso) : 13,6 AMBA (méso): 10,2 (FLD) Tébuconazole : 26,1 Métabolite 1 (Teb) : 22,3 Métabolite 2 (Teb) : 24,5

RESULTATS/ DISCUSSION

Etude de la biodégradation de la mésotrione, pure et formulée, par différentes souches bactériennes : vers un mécanisme commun de biodégradation

Ce travail de thèse fait suite à celui de Stéphanie Durand [2007], qui avait réalisé un large criblage de souches (140 souches testées bactériennes, fongiques ou levures, commerciales ou isolées de différents compartiments environnementaux contaminés : eau ; sol ; eau de nuages) à partir de la souchothèque du laboratoire pour trouver des souches capables de biodégrader la mésotrione. Son travail s'était ensuite focalisé sur la souche la plus efficace (100% de dégradation en 1h pour une solution de mésotrione 0,1 mM): *Bacillus* sp. 3B6 pour établir les voies de biodégradation de la mésotrione par cette souche bactérienne, isolée de l'eau de nuages.

Suite à cette étude, des travaux, réalisés en collaboration avec Isabelle Batisson, MCF au laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE, Université Blaise Pascal), ont visé à isoler des souches capables de dégrader la mésotrione à partir de sols noirs de la plaine de Limagne (Auvergne), vierges de toute contamination par des pesticides depuis plus de 15 ans. En utilisant des techniques d'enrichissement [Batisson *et al.*, 2009], plusieurs souches ont été isolées, dont en particulier 16 souches de *Bacillus*. Après études morphologiques macro- et microscopiques suivies d'essais d'identification par PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) [Porwal *et al.*, 2009] de ces différentes souches, seules six souches différentes, notées *Bacillus* sp. IB1, IB4, IB8, IB10, IB11 et IB13, ont été retenues pour étudier leur capacité dégradante vis-à-vis de la mésotrione.

Afin de compléter cette étude et de mettre en évidence un mécanisme commun potentiel de biodégradation, nous avons également décidé de travailler avec les trois souches isolées d'eau de nuages, précédemment mises en évidence lors du criblage initial effectué par Stéphanie Durand : *Bacillus* sp. 7B11, *Pantoea* sp. 6B2 et *Pseudomonas syringae* 12B8, qui

avaient dégradé totalement la solution de mésotrione 0,1 mM après 24, 48 et 24 h d'incubation, respectivement.

Enfin, suite à l'étude bibliographique sur la biodégradation de la mésotrione [Pileggi *et al.*, 2012] et à nos études d'impact sur la croissance de microorganismes, nous avons intégré à cette étude une autre souche Gram négatif *Escherichia coli* ATCC 11303.

Nous avons dans un premier temps comparé ces dix souches bactériennes en termes de cinétique de dissipation de la mésotrione avec celle obtenue avec notre souche de référence *Bacillus* sp. 3B6, puis nous avons étudié plus en détails les voies métaboliques de chacune d'elles.

I. Etude comparative des cinétiques de dissipation de la mésotrione pure par les souches bactériennes testées

Pour chaque souche, les cellules bactériennes en phase de repos métabolique sont mises à incuber à 27°C et sous agitation de 200 rpm, à raison d'environ 5 g de biomasse humide dans 100 mL d'une solution de mésotrione 1 mM (340 mg.L⁻¹). Des prélèvements sont faits régulièrement et les cinétiques de disparition de la mésotrione sont suivies par HPLC sur 3-4 jours. Notons que des témoins « cellules » dans l'eau de Volvic sont réalisés en parallèle dans les mêmes conditions, ainsi qu'un témoin mésotrione. Aucune dissipation de la mésotrione n'a été observée dans nos conditions d'incubation au cours du temps pour ce témoin abiotique.

Pour plus de clarté, nous présenterons les résultats en deux parties : d'une part ceux correspondant à l'ensemble des souches de *Bacillus* sp. et d'autre part, ceux concernant les autres souches, notre référence étant toujours *Bacillus* sp.3B6.

I.1. Etude comparative des cinétiques de dissipation de la mésotrione pure par sept souches de *Bacillus* sp.

Afin de pouvoir comparer les cinétiques obtenues avec les différentes souches de *Bacillus* sp. à tester, nous avons travaillé avec une quantité de biomasse humide engagée (5,1 à 5,5 g) similaire après vérification de la DO de la culture (entre 9,1 et 9,9) (Cf. Partie

Matériels et Méthodes). Des étalements sur milieu TS en boîte de Pétri ont également permis de vérifier que la concentration cellulaire était également proche (entre 4 et 12 x 10⁸ cellules/mL) (Tableau 19).

Il faut noter que la souche *Bacillus* sp. 3B6 culotte très mal, ce qui rend difficile la détermination de sa biomasse et que la souche *Bacillus* sp. IB8 présente une forme de colonies particulières, dont le dénombrement est délicat, mais qui du coup peut permettre son identification (Figure 34).

Tableau 19 : Dénombrement des cellules

Souches testées	Nombre de cellules/mL	Souches testées	Nombre de cellules/mL
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	1,0 x 10 ⁹	<i>Bacillus</i> sp. IB10	4,0 x 10 ⁸
<i>Bacillus</i> sp. IB1	3,7 x 10 ⁸	<i>Bacillus</i> sp. IB11	9,2 x 10 ⁸
<i>Bacillus</i> sp. IB4	6,0 x 10 ⁸	<i>Bacillus</i> sp. IB13	8,6 x 10 ⁸
<i>Bacillus</i> sp. IB8	2 ~ 4 x 10 ⁸	<i>Bacillus</i> sp. 7B11	1,2 x 10 ⁹

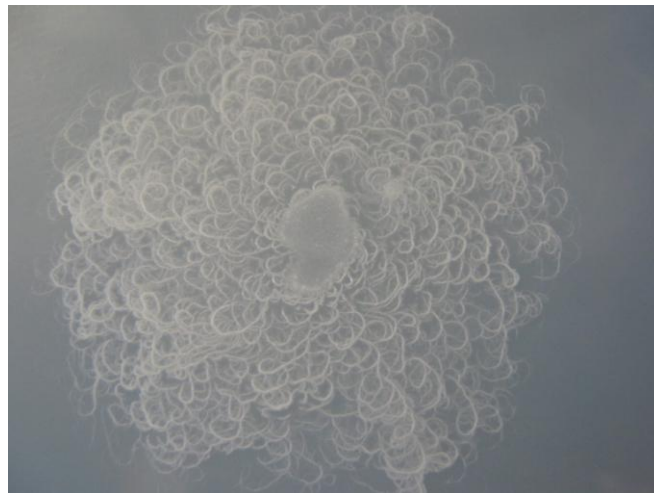


Figure 34 : Souche *Bacillus* sp. IB8 cultivée sur milieu gélosé

En effet, *Bacillus mycoides*, bactérie du sol, appartenant au groupe *Bacillus cereus*, est décrite comme croissant sur milieu gélosé sous la forme de chainettes de cellules liées bout à bout, formant des filaments « radiaux » qui s'incurvent soit dans le sens des aiguilles d'une

montre (SYN), soit dans le sens inverse (DX) [Di Franco *et al.*, 2002]. C'est ce que l'on observe avec *Bacillus* sp. IB8.

Les résultats des cinétiques de dissipation de la mésotrione 1 mM par les différentes souches de *Bacillus* sp., suivies par HPLC, sont présentés sur la Figure 35.

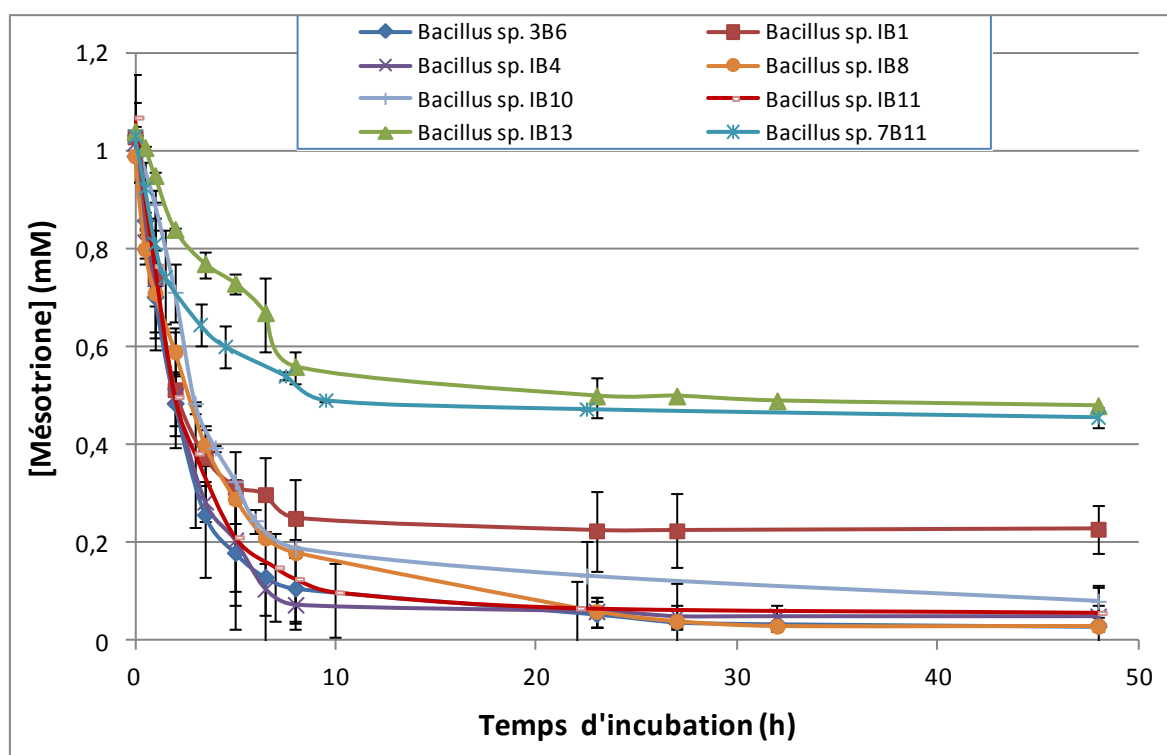


Figure 35 : Cinétiques de dissipation de la mésotrione (1 mM) par différentes souches de *Bacillus* sp. 3 à 10 réplicats suivant la souche

Les cinétiques de dissipation de la mésotrione sont plus ou moins rapides suivant les souches testées et le taux de disparition final est également variable.

En comparant les cinétiques de dissipation obtenues, nous pouvons discriminer 3 groupes de souches de *Bacillus* en fonction de leur capacité dégradante :

- les souches IB4 et IB11 qui présentent des cinétiques très semblables à celle de notre souche référence, *Bacillus* sp. 3B6. Une disparition totale de la mésotrione est observée après 24h d'incubation avec une constante de vitesse quasi-identique pour les trois souches (Tableau 20) ;

- les souches IB8 et IB10, qui montrent également une dissipation quasi-complète de la mésotrione mais avec des cinétiques plus lentes (Tableau 20). Ces deux souches sont un peu moins efficaces ;

- les souches IB1, IB13 et 7B11, pour lesquelles seule une dissipation partielle de la mésotrione est observée (entre 50 et 70%) après 48h d'incubation et qui sont donc peu efficaces (Tableau 20). Il faut noter que la dissipation se déroule pendant les premières 10h d'incubation, puis un plateau est observé.

Nous avons également déterminé les constantes de vitesse, en estimant que les cinétiques obéissaient à des lois du premier ordre sur les 24 premières heures. Les constantes de vitesse obtenues sont rassemblées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Récapitulatif des données concernant les cinétiques de dissipation de la mésotrione (1 mM) par les souches de *Bacillus* sp. testées

Souches testées	Pourcentage de dissipation		Constantes de vitesse	
	après 9h d'incubation	après 48h d'incubation	k (h ⁻¹)	R ²
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	96,1 %	100%	0,45	0,948
<i>Bacillus</i> sp. IB1	51,5 %	68 %	0,10	0,982
<i>Bacillus</i> sp. IB4	95,7 %	100 %	0,41	0,987
<i>Bacillus</i> sp. IB8	81,1 %	99,7 %	0,22	0,988
<i>Bacillus</i> sp. IB10	83,3 %	99,6 %	0,24	0,992
<i>Bacillus</i> sp. IB11	93,8 %	100 %	0,36	0,982
<i>Bacillus</i> sp. IB13	46,1 %	53,1 %	0,07	0,976
<i>Bacillus</i> sp. 7B11	52,5%	58,3 %	0,09	0,914

Les valeurs de R² pour toutes les souches reflètent bien que la réaction de dissipation de la mésotrione peut être assimilée à une cinétique du premier ordre. D'autre part, les constantes de vitesse k confirment la répartition des souches testées en 3 groupes : (i) Les souches IB4 et IB11 ont un comportement très similaires à la souche *Bacillus* sp. 3B6 ; (ii) les souches IB8 et IB10 sont moins rapides mais conservent une bonne efficacité pour dissiper la mésotrione 1 mM à presque 100 % ; (iii) enfin, pour les souches IB1, IB13 et 7B11, la disparition est très lente (vitesse divisée par un facteur 4) et incomplète.

Les souches bactériennes, capables de dissiper la mésotrione, conservent leur efficacité sur de longues périodes de temps, car la réalisation des réplicats de biodégradation a été parfois effectuée sur toute la durée de la thèse. Pour une biomasse bactérienne similaire, seules des différences négligeables ont été observées dans les cinétiques de dissipation.

I.2. Etude comparative des cinétiques de dissipation de la mésotrione pure par des souches Gram négatif

Les cinétiques de dissipation de la mésotrione 1 mM par les souches dégradantes, *Escherichia coli* ATCC 11303, *Pantoae* sp. 5B12 et *Pseudomonas syringae* 12B8, suivies par HPLC sont présentées sur la Figure 36.

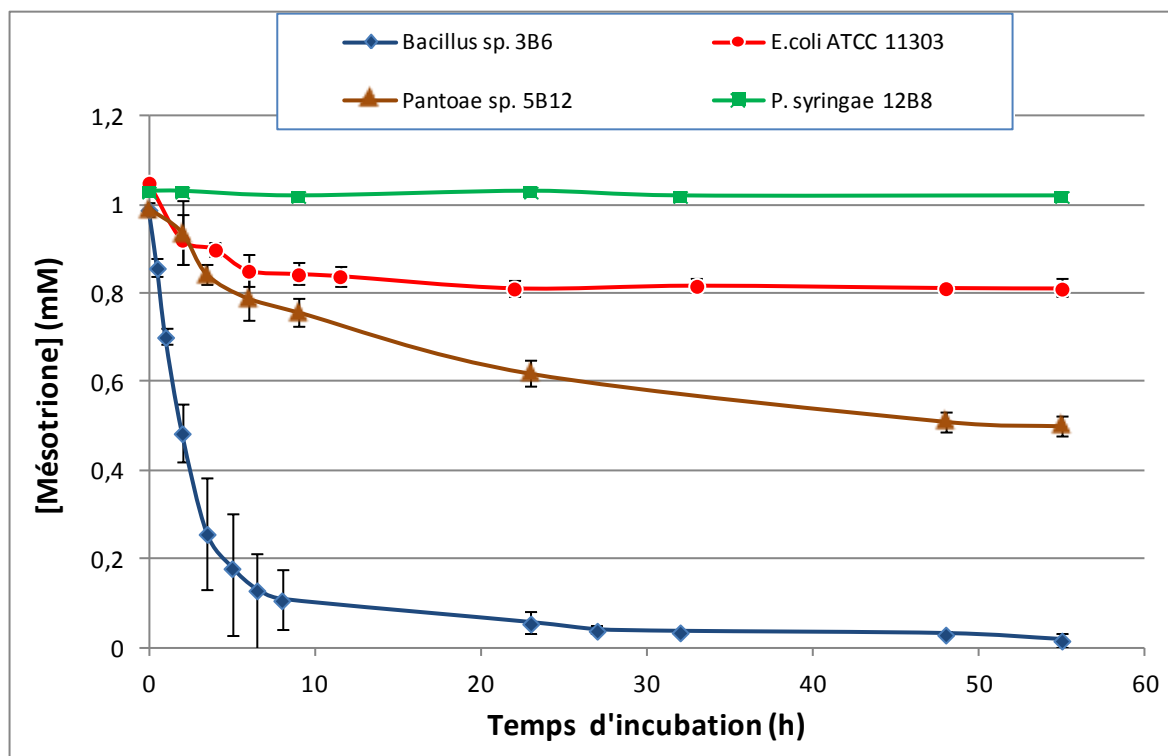


Figure 36 : Cinétiques de dissipation de la mésotrione (1 mM) par différentes souches retenues après le criblage initial de S. Durand (2007). 2 à 4 réplicats suivant la souche

La surprise vient de la souche *Pseudomonas syringae* 12B8, qui a été retenue suite au criblage initial par S. Durand car elle avait montré des capacités de biotransformation de la mésotrione. En effet, une complète disparition d'une solution de mésotrione 0,1 mM avait été obtenue en 24h d'incubation en présence de 5 g de biomasse humide (cellules au repos). Ici, en travaillant avec une solution dix fois plus concentrée, aucune diminution de la concentration de la mésotrione n'est observée après 48h d'incubation.

Les deux autres souches, *E. coli* ATCC 11303 et *Pantoae* sp. 5B12, dissipent environ 20 et 50 % de la mésotrione 1 mM, respectivement. La dissipation par *E. coli* se déroule pendant les 20 premières heures d'incubation puis un plateau est observé (Figure 36) alors qu'avec la souche *Pantoae* sp. 5B12, la dissipation continue pendant les 55h d'incubation,

puis s'arrête presque totalement (2 % de dissipation supplémentaire entre 55 heures et 5 jours). Là encore, la biomasse humide utilisée pour chacune de ces souches est similaire avec celle de la souche référence, *Bacillus* sp. 3B6. Les constantes de vitesse ont également été calculées sur les 24 premières heures d'incubation (Tableau 21).

Tableau 21 : Récapitulatif des données concernant les cinétiques de dissipation de la mésotrione (1mM) par différentes souches dégradantes

Souches testées	Pourcentage de dissipation		Constantes de vitesse	
	après 9h d'incubation	après 48h d'incubation	k (h ⁻¹)	R ²
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	96,1 %	100%	0,45	0,948
<i>E. coli</i> ATCC 11303	20,3 %	23,3 %	0,025	0,888
<i>Pantoea</i> sp. 5B12	23,7 %	50,5 %	0,03	0,931
<i>P. syringae</i> 12B8	0%	0%	-	-

Les constantes de vitesse permettent de classer ces deux souches dans le groupe des *Bacillus* sp. précédemment étudiés le moins performant avec une dissipation encore plus lente et non complète.

En ce qui concerne ces deux souches, nous avons voulu tester si une augmentation de biomasse permettrait d'augmenter le taux de dissipation de la mésotrione. Nous avons donc « quasiment » doublé la biomasse bactérienne humide mise en réaction (expérience réalisée avec 8 erlenmeyers de culture au lieu de 5 classiquement). Pour *Pantoea* sp. 5B12, la biomasse a un effet important sur la cinétique de dissipation et sur le pourcentage de mésotrione dégradé en fin d'expérience (Figure 37). Avec une biomasse plus importante, on observe une forte accélération de la dissipation pendant les 12 premières heures d'incubation, qui atteint un taux de disparition de la mésotrione de 82%, suivie d'un plateau. Dans les conditions classiques, seulement 50,5 % de la mésotrione a disparu au bout de 55h. Le taux de dissipation est donc proportionnel au nombre de cellules présentes.

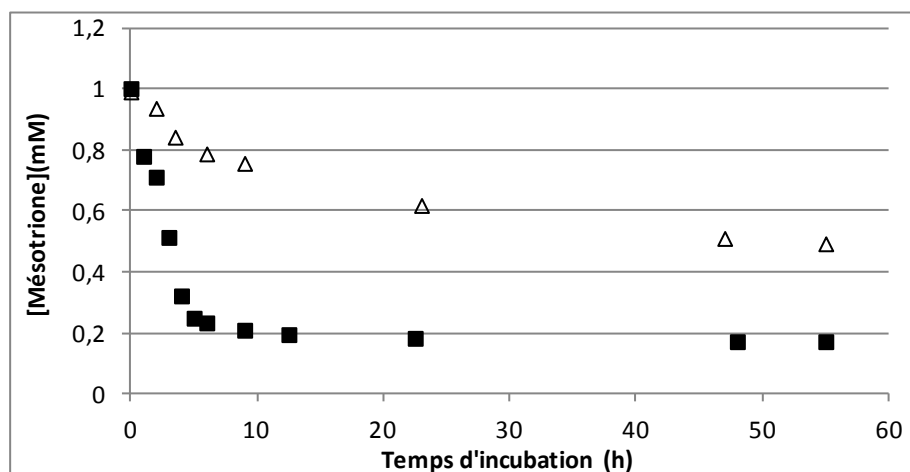


Figure 37 : Effet de la quantité de biomasse bactérienne sur la dissipation de la mésotrione par la souche *Pantoae* sp. 5B12. ( ) 500 mL de culture, m= 5,2 g et (■) 800 mL de culture, m= 7,8 g

De même pour *E. coli* ATCC 11303, les cinétiques de dissipation de la mésotrione dépendent fortement de la biomasse bactérienne (Figure 38). La vitesse de la dissipation de la mésotrione augmente proportionnellement à la biomasse bactérienne. Par contre, quelle que soit la biomasse, un plateau est observé après 22 heures d'incubation. Deux hypothèses pourraient expliquer l'apparition du plateau :

1 - Le milieu (eau de Volvic ) ne contenant pas de nutriments, les cellules s'épuisent au cours du temps.

2- L'accumulation de métabolites peut-être toxiques pour les cellules bactériennes ou inhiber les enzymes impliquées dans la dissipation de la mésotrione.

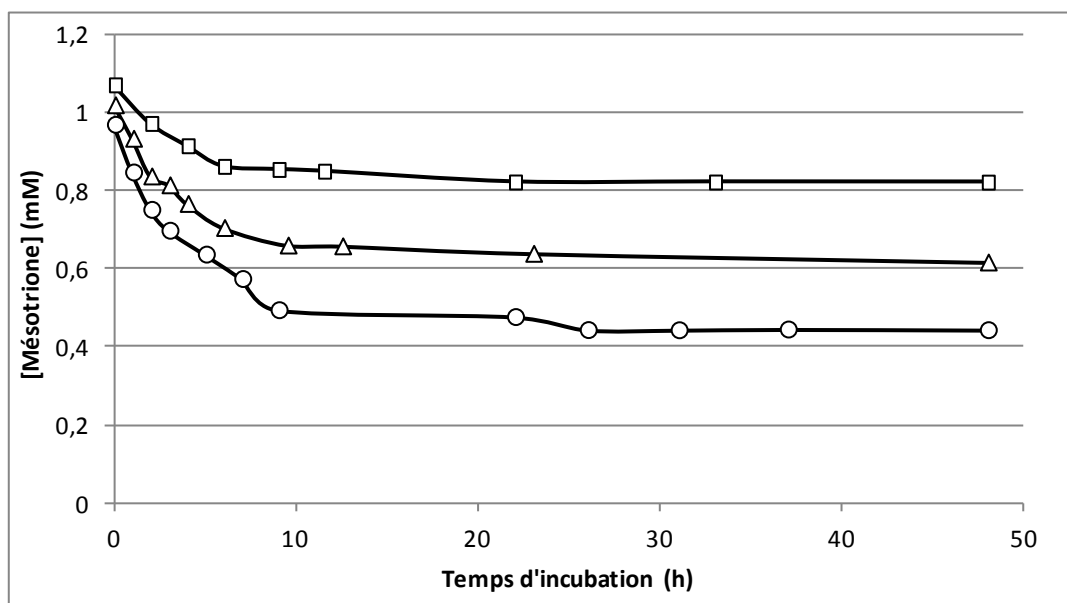


Figure 38 : Effet de la quantité de biomasse bactérienne sur la dissipation de la mésotrione par la souche *E. coli* ATCC 11303. (□) 500 mL de culture, m = 5,2 g ; (△) 700 mL de culture, m = 7,9 g et (○) 800 mL de culture, m = 8,8 g

Comme attendu, la biomasse bactérienne est bien un paramètre clef influant sur la cinétique et le pourcentage de dissipation.

Nous avons noté que pour la plupart des souches, un plateau est observé lors de la dissipation de la mésotrione, généralement après 10 à 24h d'incubation. Nous avons donc comparé les cinétiques de dissipation de la mésotrione (1 mM) par *E. coli* ATCC 11303 dans l'eau de Volvic ® et dans un milieu minéral contenant une source d'azote (le sulfate d'ammonium, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Les résultats sont présentés sur la Figure 39.

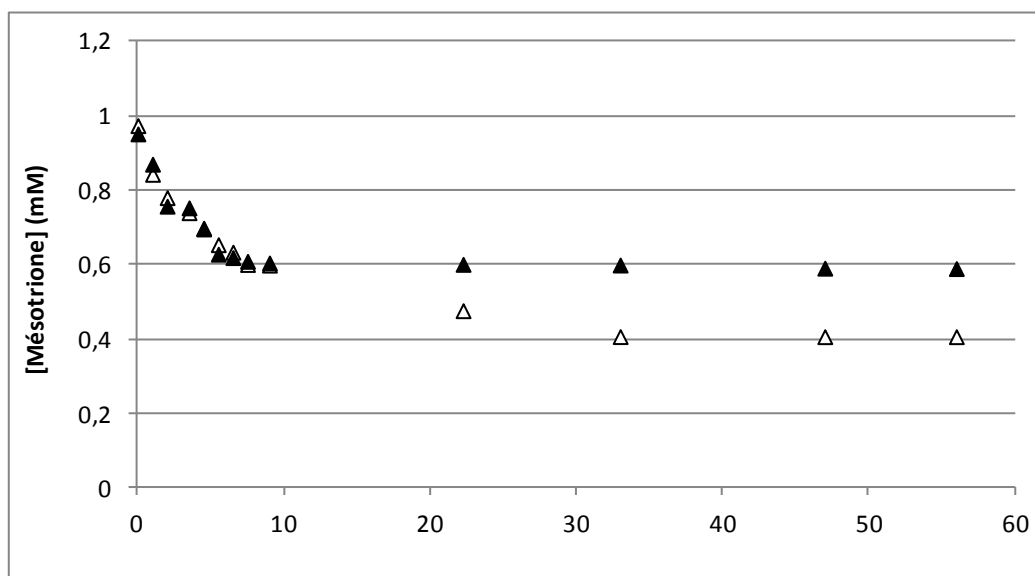


Figure 39 : Effet du milieu d'incubation sur la dissipation de la mésotrione (1 mM) par la souche *E. coli* ATCC 11303. Eau de Volvic® (Δ) et milieu minimum (▲)

La Figure 39 montre que la dissipation n'est pas améliorée dans le milieu minimum comme milieu d'incubation. Si les cinétiques de disparition de la mésotrione sont relativement similaires jusqu'à 9h d'incubation, que les cellules soient dans l'eau ou dans le milieu minimum, un arrêt complet de celle-ci est observée après 10h et un plateau correspondant à 40% de disparition est obtenu avec le milieu minimum (diminution de 20 % par rapport à l'eau de Volvic®). La différence de composition (présence d'ions en plus grande concentration, apport d'une source d'azote) et de pH doit expliquer cette différence. On peut faire l'hypothèse qu'en présence d'une source d'azote, les cellules utilisent des métabolites ou des composés carbonés libérés par les cellules lysées pour croître et ne dégradent plus la mésotrione.

I.3. Conclusion

Une dizaine de souches bactériennes, issues du criblage initial ou de la littérature, ont été testées pour leur capacité à dissiper la mésotrione dans des conditions de repos métaboliques. Seule une ne l'a pas dégradée dans nos conditions (*Pseudomonas syringae* 12B8) et les autres ont montré des efficacités variables d'une souche à l'autre. Deux souches de *Bacillus*, IB4 et IB11, isolées de sols, présentent des caractéristiques de dissipation très similaires à celle de notre souche référence *Bacillus* sp. 3B6 avec une disparition rapide de la mésotrione (1 mM).

Il est également intéressant de noter que deux souches Gram négatif, *Pantoea* sp. 5B12 et *E. coli* ATCC 11303, rarement décrites dans la littérature pour leurs capacités à dégrader les xénobiotiques (bien qu'une souche de *Pantoea ananatis*, isolée d'un lac du Brésil, se soit révélée capable de biotransformer la mésotrione [Pileggi *et al.*, 2012]), ont montré de bonnes activités dégradantes vis-à-vis de la mésotrione, notamment en augmentant la biomasse bactérienne par rapport à la concentration classiquement utilisée lors de cette étude.

II. Etude comparative des voies métaboliques de biodégradation de la mésotrione pure par les souches bactériennes testées

Grâce à l'utilisation de techniques complémentaires d'analyses, à savoir la LC/MS et la RMN, Durand *et al.* [2006b, 2010] ont proposé un schéma métabolique détaillé de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 (Figure 40). Six métabolites ont été identifiés et deux voies de biodégradation ont pu être mises en évidence. La voie majoritaire commence par la réduction de la fonction nitro en hydroxylamine qui donne **M2**, ce dernier étant en équilibre avec **M3**, formé par cyclisation intramoléculaire (benzoxisoxazolol). **M3**, relativement instable en conditions aérobies, peut soit perdre une molécule d'eau conduisant à **M4**, soit libérer la partie cyclohexanedione et conduire à l'**AMBA**. La deuxième voie minoritaire correspond à la rupture oxydative entre les deux cycles libérant le **MNBA**, qui est rapidement réduit en **AMBA**, et le cycle cyclohexanedione, qui est, lui, rapidement transformé en **glutarate**. Dans les deux cas, l'**AMBA** est le métabolite terminal obtenu qui s'accumule dans le milieu. Rappelons que ces deux métabolites MNBA et AMBA sont décrits par Mitchell *et al.* [2001], comme les seuls métabolites de la mésotrione retrouvés dans l'environnement.

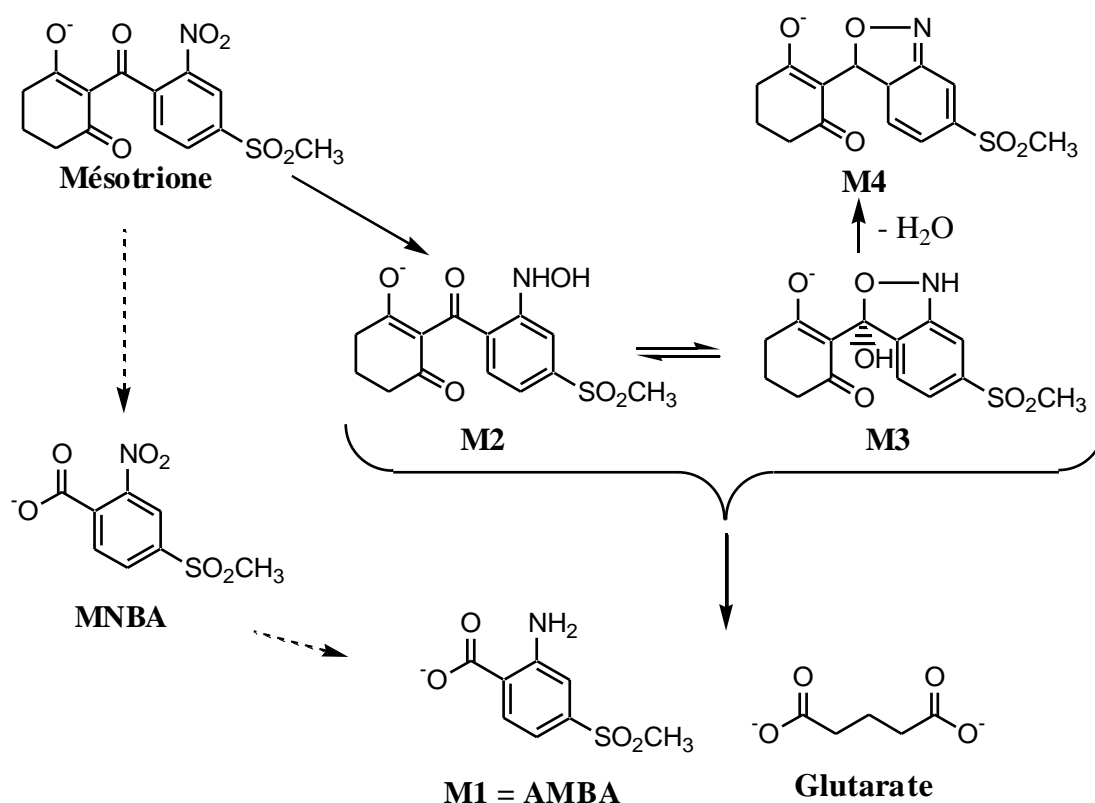


Figure 40 : Schéma métabolique de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. 3B6 (d'après Durand *et al.*, 2010)

L'objectif était donc ici de comparer les voies de biodégradation des souches précédemment identifiées comme dégradantes en termes de cinétique mais aussi de métabolites formés avec celles observées par notre souche de référence (*Bacillus* sp. 3B6), afin de définir un éventuel mécanisme commun de biodégradation de la mésotrione. Pour ce faire, nous avons travaillé simultanément et systématiquement en HPLC (sensibilité pour détecter de nouveaux métabolites présents mais impossibilité de quantifier certains métabolites pour lesquels nous n'avons pas de standards) et en RMN ^1H (vision sans *a priori* de tous les métabolites présents avec possibilité de quantification grâce à la présence d'une référence interne) en comparant les caractéristiques de chaque métabolite obtenu avec celles décrites dans la thèse de S. Durand [2007].

II.1. Vérification de l'adéquation quantitative entre analyses par HPLC et RMN ^1H

Nous avons tout d'abord vérifié que les quantifications réalisées pour la mésotrione et l'AMBA, seuls composés pour lesquels nous disposions de standards, par HPLC et RMN ^1H

étaient bien identiques. L'évolution relative des autres métabolites a également été comparée entre ces deux techniques d'analyse afin de s'assurer qu'aucun biais n'était possible et pouvoir, le cas échéant, utiliser l'une ou l'autre technique pour présenter en détails les résultats. En effet, si la RMN permet de tout voir *a priori*, à condition que la concentration soit suffisante ($\sim 50 \mu\text{M}$), les nombreux signaux, provenant de la dégradation du xénobiotique mais aussi des métabolites endogènes des cellules, peuvent rendre difficile la quantification des métabolites d'intérêt.

II.1.1 Suivi et quantification de la mésotrione

Chaque expérience de biodégradation a été systématiquement analysée par HPLC et RMN ^1H . Nous avons pu montrer que le suivi de la concentration en mésotrione dans nos échantillons par ces deux techniques, quelle que soit la souche, était complètement superposable et que la quantification était fiable par les deux techniques (Figure 41).

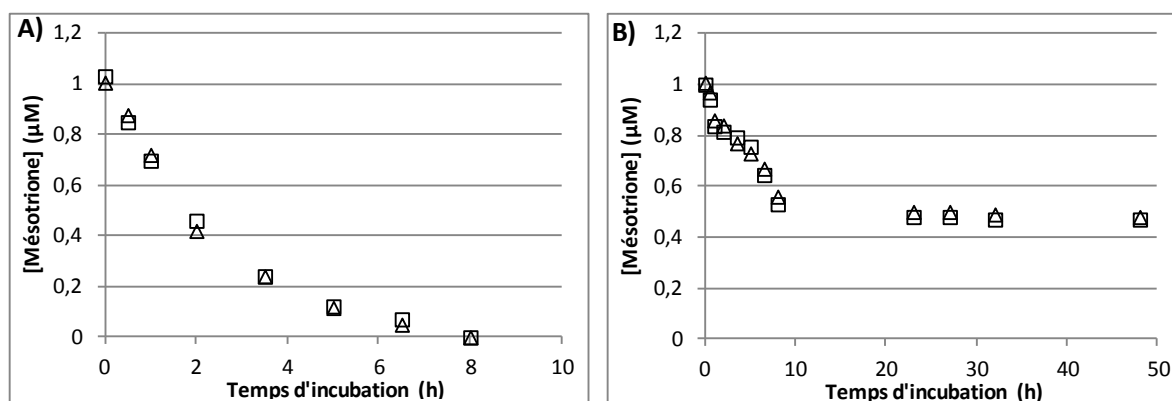


Figure 41 : Exemples de quantification comparée de la mésotrione par HPLC (Δ) et RMN ^1H (\square) lors de sa biodégradation par (A) *Bacillus* sp. 3B6 et (B) *Bacillus* sp. IB13

II.1.2 Suivi et quantification du métabolite principal, l'AMBA

Le métabolite principal de la mésotrione (AMBA) venant d'être commercialisé, nous avons pu réaliser des droites d'étalonnage sur la HPLC et comparer les réponses quantitatives entre la RMN et la HPLC. Coté HPLC, il s'agit d'un composé fluorescent, donc détectable avec le fluorimètre à faible concentration. Il devient quantifiable en UV autour de $10 \mu\text{M}$ et ce détecteur est préférable à fortes concentrations, le fluorimètre étant alors saturé (vers $0,3 \text{ mM}$). En RMN, la quantification est possible à partir d'une concentration de $50 \mu\text{M}$ (en

métabolite). L'adéquation des quantifications entre les deux techniques est très bonne au delà de cette concentration.

II.1.3 Suivi des autres métabolites

Les autres métabolites décrits (M2, M3 et M4) sont détectables par HPLC-UV mais n'ayant pas de standard, nous ne pouvons les quantifier par cette technique d'analyse. Nous avons cependant systématiquement comparé les allures des courbes obtenues pour leur évolution entre HPLC (qualitatif) et RMN (quantitatif). Elles ont toujours été très similaires (Figure 42).

Dans tous les cas, aucun phénomène d'interférence avec la matrice n'a été observé de manière significative dans toutes nos analyses par HPLC et les allures des cinétiques, aussi bien de disparition de la mésotrine que d'apparition des métabolites, ont toujours été très similaires entre analyses par HPLC et par RMN.

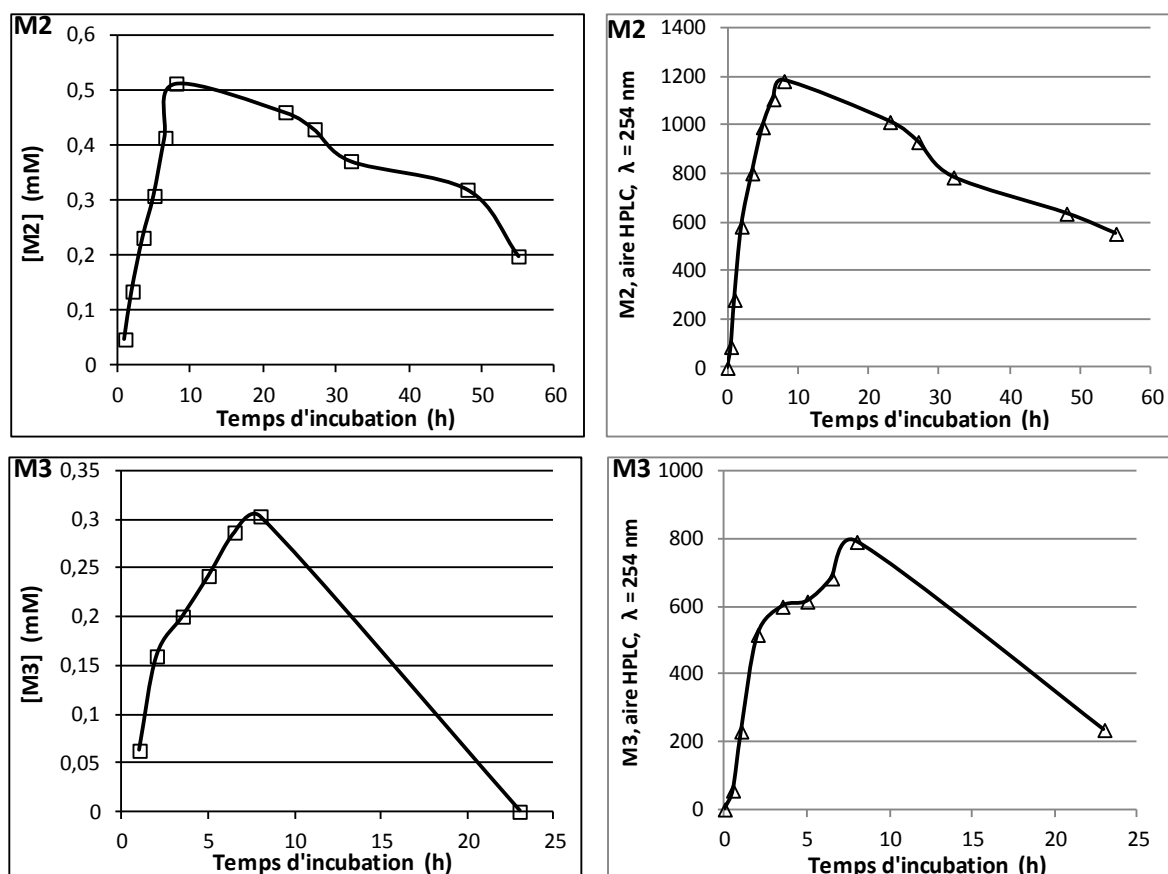


Figure 42 : Exemples de comparaison des cinétiques d'apparition et de disparition des métabolites M2 et M3 lors de la biodégradation de la mésotrine 1 mM par la souche *Bacillus* sp. IB4 par RMN (colonne de gauche) et par HPLC (colonne de droite)

II.2. Suivi de l'évolution des métabolites lors de la biotransformation de la mésotrione pure par *Bacillus* sp. 3B6

Les premières expériences de biotransformation de la mésotrione (1 mM) ont été réalisées avec la souche de référence, *Bacillus* sp. 3B6, afin de vérifier que l'ensemble des métabolites décrits par Durand *et al.* [2006b, 2010] étaient bien détectés et dans des concentrations similaires.

Les chromatogrammes HPLC correspondants à plusieurs temps d'incubation sont présentés sur la Figure 43 et montrent, outre la disparition de la mésotrione, la présence de nouveaux pics correspondant aux métabolites **M1** = **AMBA** (t_R = 10,2 min), **M2** (t_R = 13,5 min), **M3** (t_R = 16,5 min) et **M4** (t_R = 13,7 min), décrits précédemment. Leur évolution respective au cours du temps semble plus ou moins correspondre aux résultats obtenus précédemment. Nous pouvons cependant noter que le métabolite **M4**, qui était un métabolite final s'accumulant dans le milieu lors des études de Durand, n'est ici qu'un intermédiaire.

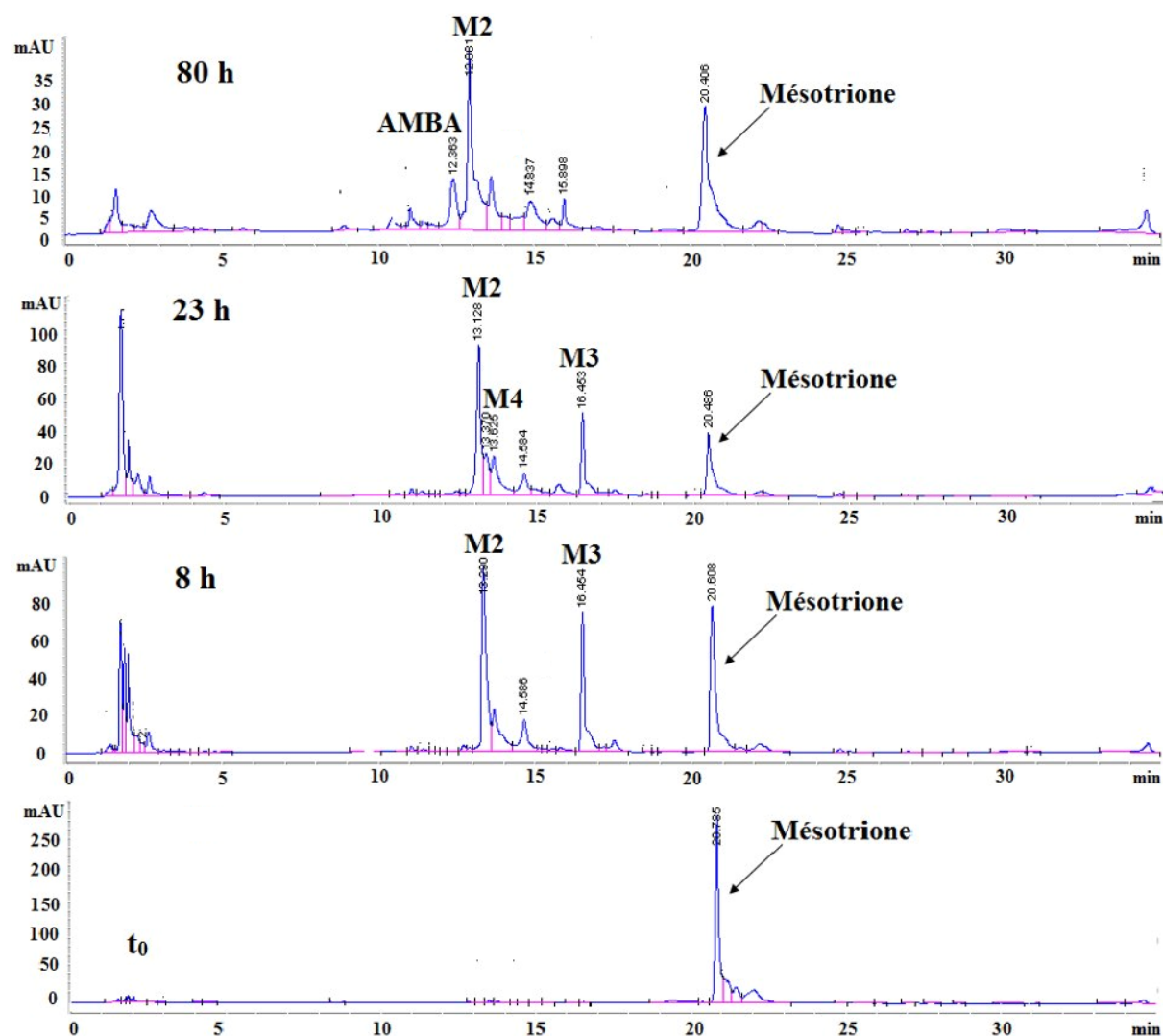


Figure 43 : Suivi par HPLC-UV de la cinétique de biotransformation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6

Pour pouvoir quantifier l'ensemble des métabolites, nous avons également réalisé un suivi cinétique par RMN ^1H . En comparant les déplacements chimiques avec ceux décrits par Durand *et al.* [2010], nous avons pu attribuer les signaux aux différents métabolites décrits, en particulier dans la zone des aromatiques plus « lisible » (Figure 44). De nombreux signaux sont également attribuables aux cellules et peuvent être repérés par rapport au témoin « cellules » réalisé systématiquement. Il faut cependant souligner que parfois la présence d'un xénobiotique induit la formation de nouveaux métabolites cellulaires absents du témoin et visibles sur les spectres RMN.

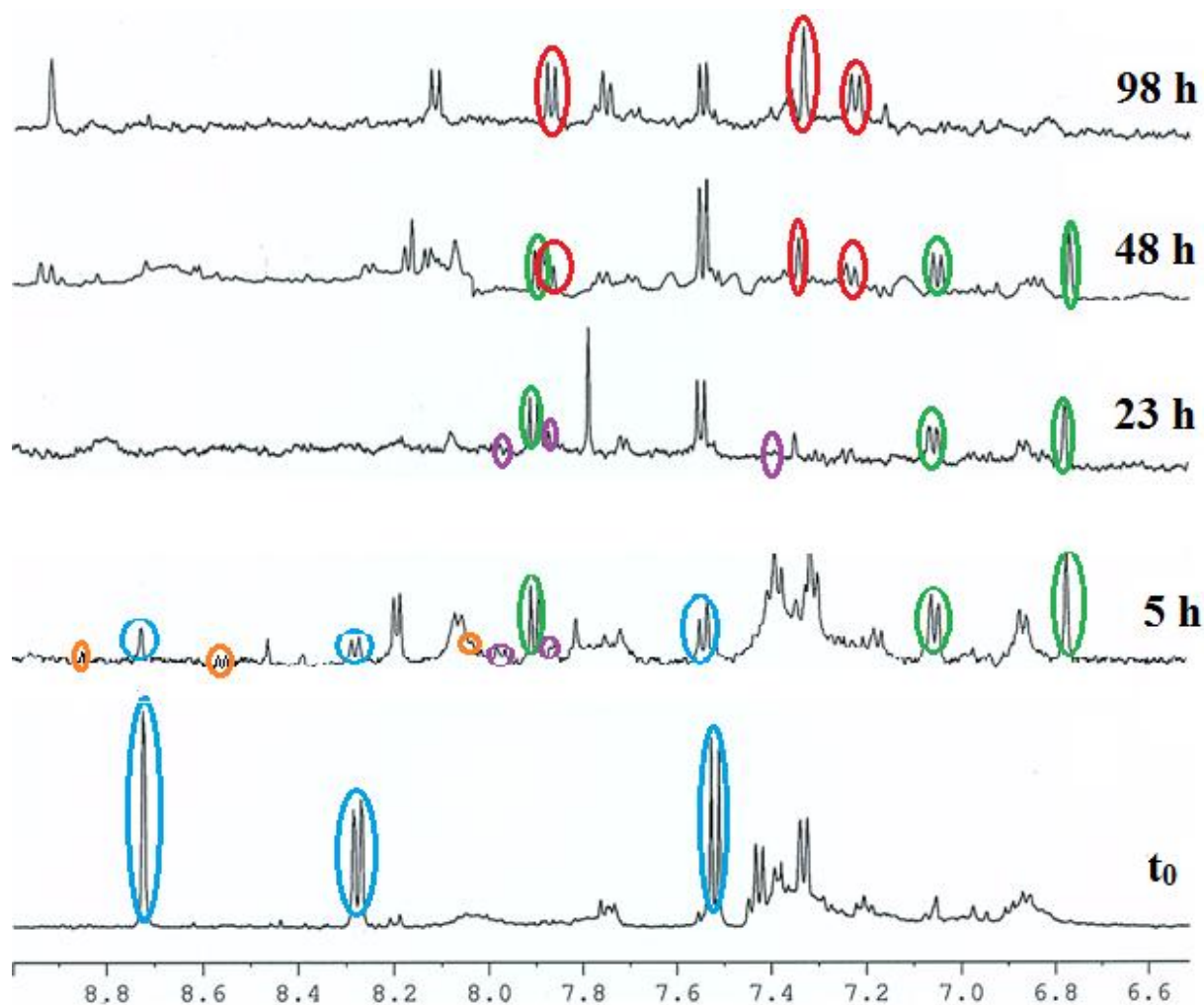


Figure 44 : Suivi par RMN ^1H de la cinétique de biotransformation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Mésotrione (bleu), AMBA (rouge), M2 (vert), M3 (mauve) et M4 (orange)

Une quantification des différentes espèces majoritaires (matière active + métabolites) est ensuite réalisée, essentiellement par RMN (Figure 45). Il faut souligner que le glutarate, mis en évidence par RMN ^1H lors des études de S. Durand, a bien été détecté mais sa quantification a été rendue difficile par la présence systématique dans la même zone de déplacement chimique (1,8-2,2 ppm) de composés cellulaires. Il est toujours en faible concentration ($< 0,1$ mM) et n'apparaît que de façon transitoire. Nous avons donc décidé de ne pas l'intégrer dans notre bilan quantitatif global afin de ne pas fausser les résultats.

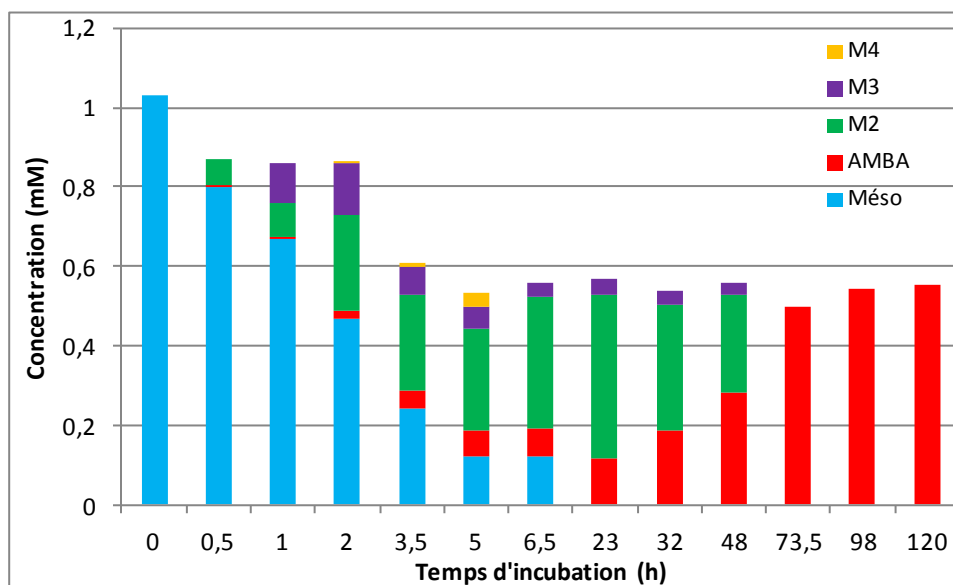


Figure 45 : Bilan quantitatif global obtenu par RMN ^1H lors de la biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6

Quelques différences sont à noter par rapport aux résultats publiés précédemment :

- le métabolite **M3** est, dans nos études, toujours en concentration beaucoup plus faible que **M2** et il persiste, par contre, beaucoup plus longtemps (jusqu'à 48h d'incubation). Dans les études précédentes, il était quasiment à la même concentration que **M2** après 6-7h d'incubation lorsqu'il était à son maximum et disparaissait après 22h.
- le métabolite **M4** apparaît et disparaît rapidement ici alors qu'il s'agissait d'un des métabolites s'accumulant en fin d'incubation lors des travaux précédents.

Pour le reste, les résultats sont relativement similaires en termes d'évolution globale : **M2** et **M3** sont des métabolites transitoires et se transforment de manière non quantitative en **AMBA**, qui reste le métabolite terminal dans ces conditions.

Une fois les différentes techniques mises en place et les métabolites repérés, nous avons repris les expériences de biodégradation de la mésotrione 1 mM par les différentes souches testées et avons suivi, de manière qualitative et quantitative, l'apparition et la disparition des métabolites déjà décrits (et éventuellement nouveaux), pour voir si le schéma biodégradatif proposé pouvait être généralisé.

Pour essayer de rendre plus clair les résultats obtenus, ils seront présentés par genre de bactéries et ne seront pas tous décrits dans le détail.

II.3. Etude comparative de l'évolution des métabolites lors de la biotransformation de la mésotrione pure par sept souches de *Bacillus* sp.

II.3.1 Souches de *Bacillus* sp. les plus efficaces

Nous allons d'abord présenter les résultats avec les quatre souches dégradant totalement la mésotrione 1 mM de manière très similaire à notre souche de référence, *Bacillus* sp. 3B6 (*Bacillus* sp. IB4 et IB11) ou avec une cinétique plus lente (*Bacillus* sp. IB8 et IB10).

Les résultats obtenus avec la souche *Bacillus* sp. IB4 sont donnés, ici, à titre d'exemple, toutes les analyses donnant des résultats similaires pour ces quatre souches. Les analyses par HPLC montrent la disparition rapide de la mésotrione mais également l'apparition des métabolites décrits précédemment. On peut noter la très forte intensité du pic de **M4** après 6h d'incubation, ce métabolite étant ici beaucoup plus concentré qu'avec *Bacillus* sp. 3B6 (Figure 46).

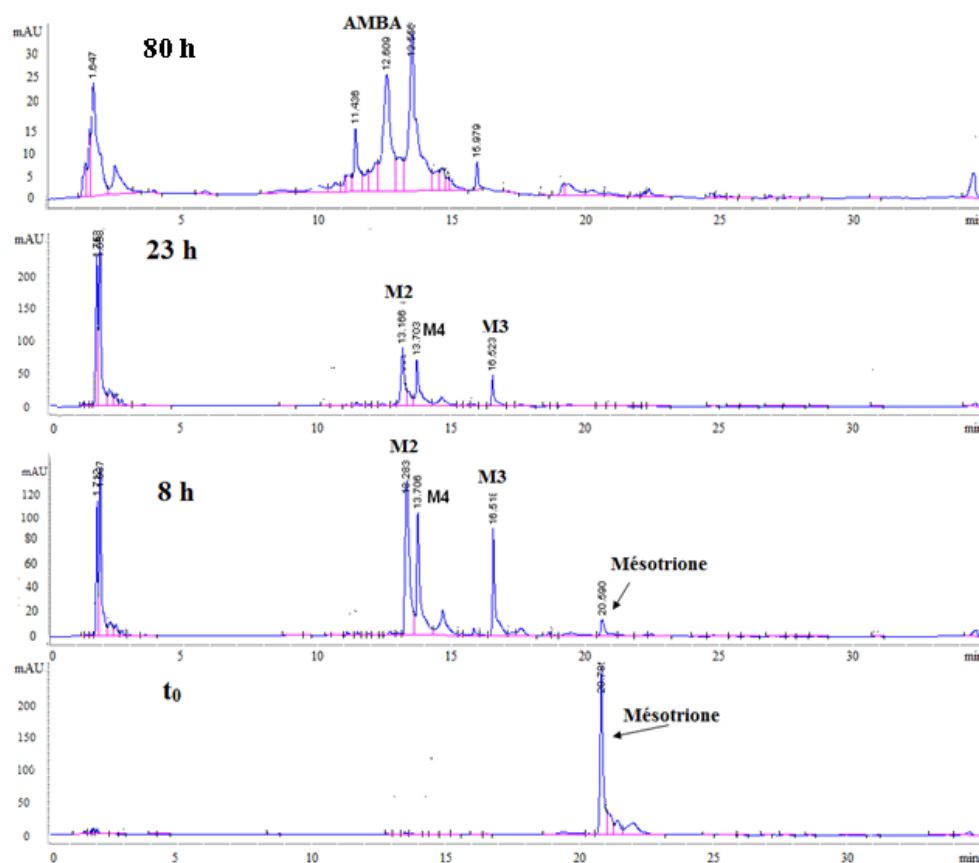


Figure 46 : Suivi par HPLC-UV de la cinétique de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. IB4

Les analyses par RMN ^1H conduisent aux mêmes conclusions (Figure 47) : **M2** est le métabolite majoritaire mais transitoire, **M3** est moins concentré avec également un temps de vie beaucoup plus court que **M2**, **M4** est nettement visible avec cette souche mais n'est également que transitoire et en fin d'incubation, l'**AMBA** reste le seul métabolite.

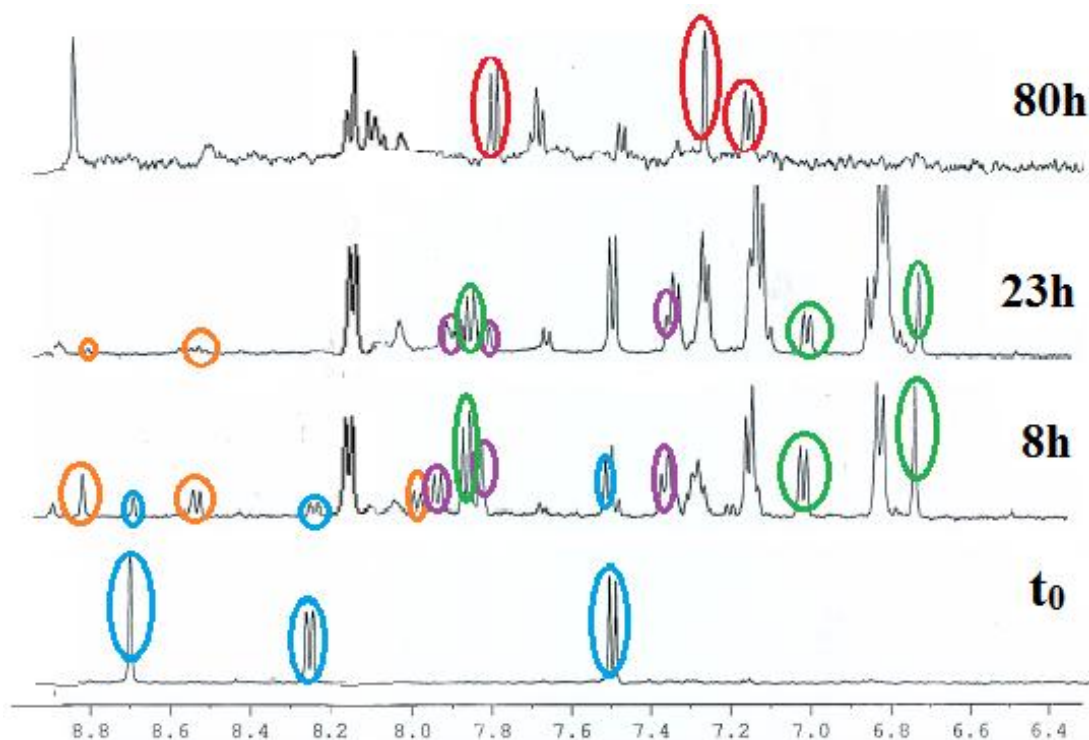


Figure 47 : Suivi par RMN ^1H de la cinétique de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Mésotrione (bleu), AMBA (rouge), M2 (vert), M3 (mauve) et M4 (orange)

Pour les quatre souches de ce groupe caractérisé par une biodégradation complète de la mésotrione, les résultats sont relativement similaires. Les métabolites **M2** et **M3** apparaissent dès 1h d'incubation (Figures 48A et B). Leurs concentrations augmentent au fil des heures pour atteindre un maximum d'autant plus important que le taux de biodégradation de la mésotrione est important et que la vitesse est rapide (*Bacillus* sp. IB4, *Bacillus* sp. IB8 et *Bacillus* sp. IB10). La concentration en **M2** est toujours plus grande que celle de **M3**, qui est un métabolite plus éphémère. Le métabolite **M4** n'a été observé qu'avec la souche *Bacillus* sp. IB4 (Figure 48C). L'AMBA est toujours le métabolite qui s'accumule seul en fin de réaction (Figure 48D). Ce maximum dépend du pourcentage de biodégradation de la mésotrione : la concentration observée est de l'ordre de 0,6 mM pour les souches les plus efficaces comme *Bacillus* sp. 3B6, *Bacillus* sp. IB10 et *Bacillus* sp. IB11 ; il atteint un plateau après 100h d'incubation, et sa concentration est légèrement moins importante pour les souches *Bacillus* sp. IB4 et *Bacillus* sp. IB8 mais toujours en augmentation.

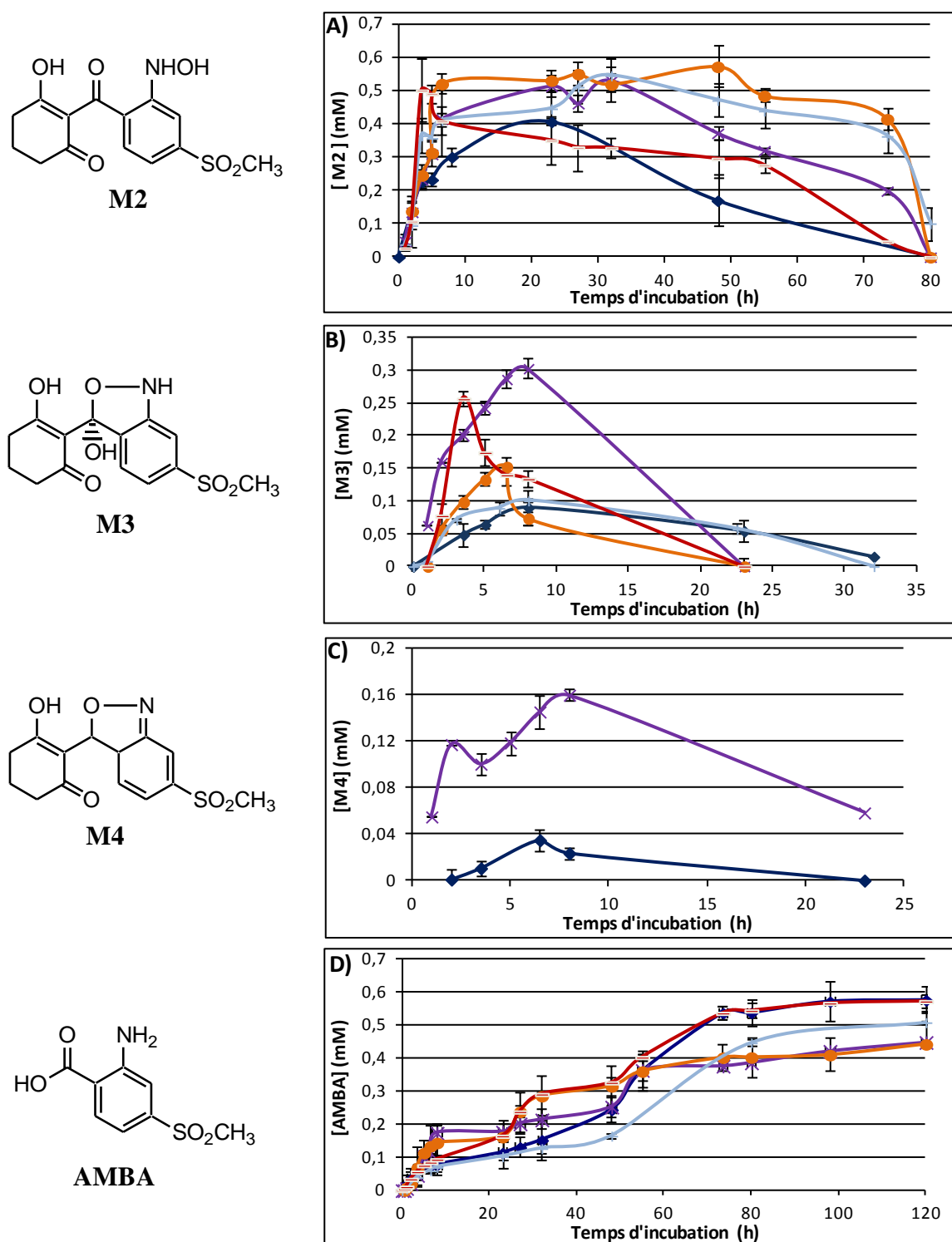


Figure 48 : Cinétiques d'évolution des métabolites de la mésotrione lors de sa biodégradation par *Bacillus* sp. 3B6 (◆), *Bacillus* sp. IB4 (*), *Bacillus* sp. IB8 (●), *Bacillus* sp. IB10 (+) et *Bacillus* sp. IB11 (—). (A) Métabolite M2 ; (B) Métabolite M3 ; (C) Métabolite M4 et (D) AMBA. 2 à 5 réplicats suivant la souche

Il est clair que les cinétiques d'apparition des métabolites dépendent de la cinétique de dissipation de la mésotrione. Cependant les allures sont très similaires. Des suivis de pH, réalisés au cours de la biodégradation de la mésotrione, ont montré une similarité presque absolue entre les souches testées, n'expliquant pas les petites variations observées dans les cinétiques ou l'apparition ou non du métabolite **M4**. Le pH en début d'expérience est proche de la neutralité ($\sim 7,5$), puis il augmente légèrement au cours de l'incubation, sans doute sous l'effet du relargage de métabolites endogènes, ne dépassant pas 9 au bout des 5 jours d'incubation.

Cas particulier de *Bacillus* sp. IB11

Les analyses HPLC des échantillons de suivi de biodégradation de la mésotrione 1 mM par *Bacillus* sp. IB11 ont montré les mêmes pics que ceux observés avec les autres souches (Figure 49).

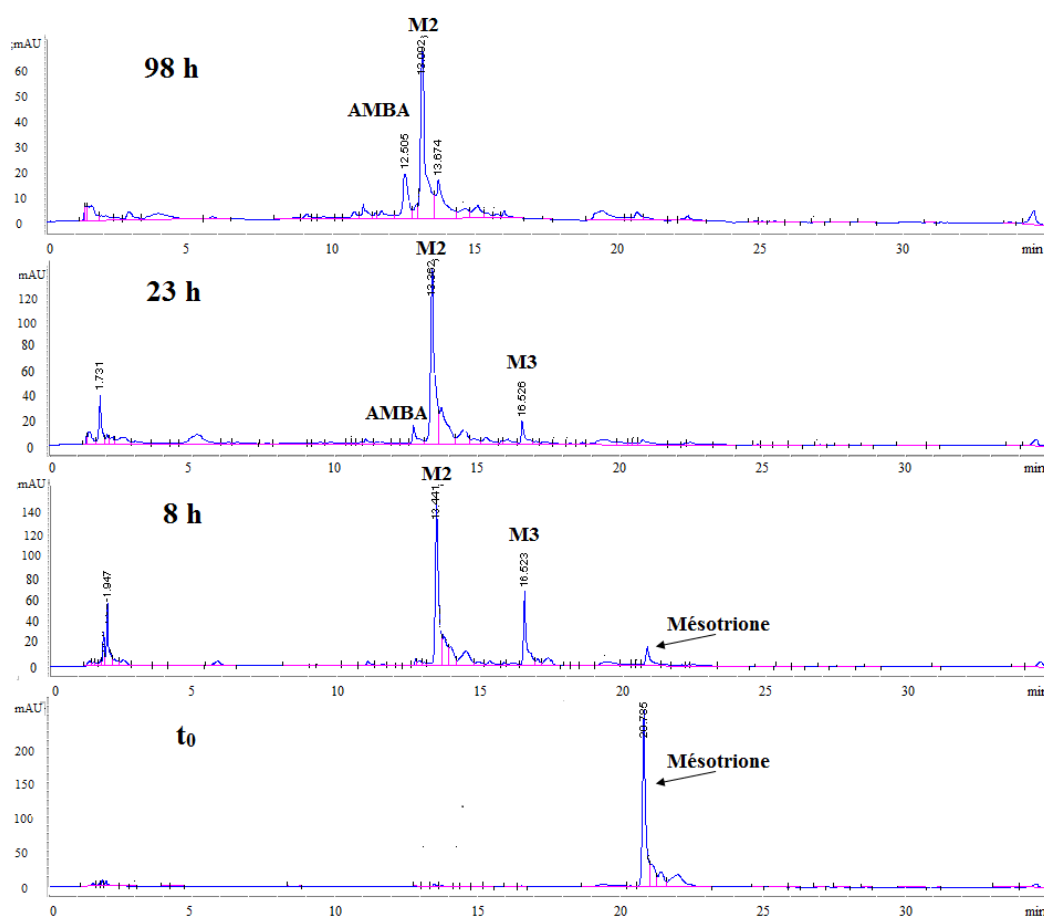


Figure 49 : Suivi par HPLC-UV de la cinétique de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. IB11

Cependant, lors des analyses par RMN ^1H , un métabolite inconnu a été détecté, se présentant sous la forme de deux doublets résonnant à 7,80 et 8,18 ppm (Figure 50). Ces deux signaux intègrent pour le même nombre de protons. Un seul nouveau signal (singulet) intégrant pour trois fois le nombre de protons des deux doublets est observé dans la zone des aliphatiques. Ce métabolite intermédiaire, nommé **Mi**, apparaît après 5h d'incubation, atteint son maximum de concentration vers 23h d'incubation et disparaît après 32h. Il faut noter qu'avec cette souche, le métabolite **M4** n'est pas détecté.

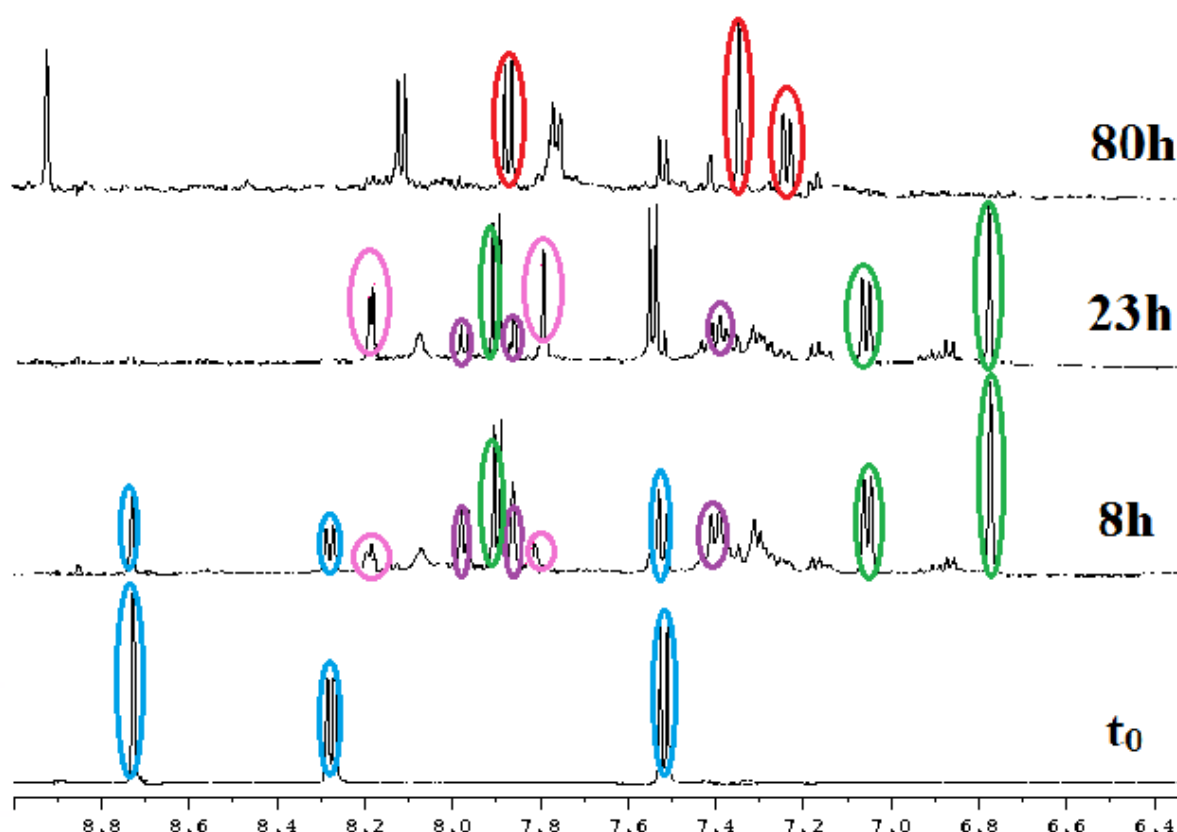


Figure 50 : Suivi par RMN ^1H de la cinétique de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. IB11. Mésotrione (bleu), AMBA (rouge), M2 (vert), M3 (mauve) et Mi (rose)

Grâce à l'analyse par RMN, il est possible de quantifier ce métabolite, en supposant que chaque doublet intègre pour un proton. Avec cette hypothèse, la concentration maximale en **Mi** atteint 0,23 mM après 23h d'incubation (Figure 51).

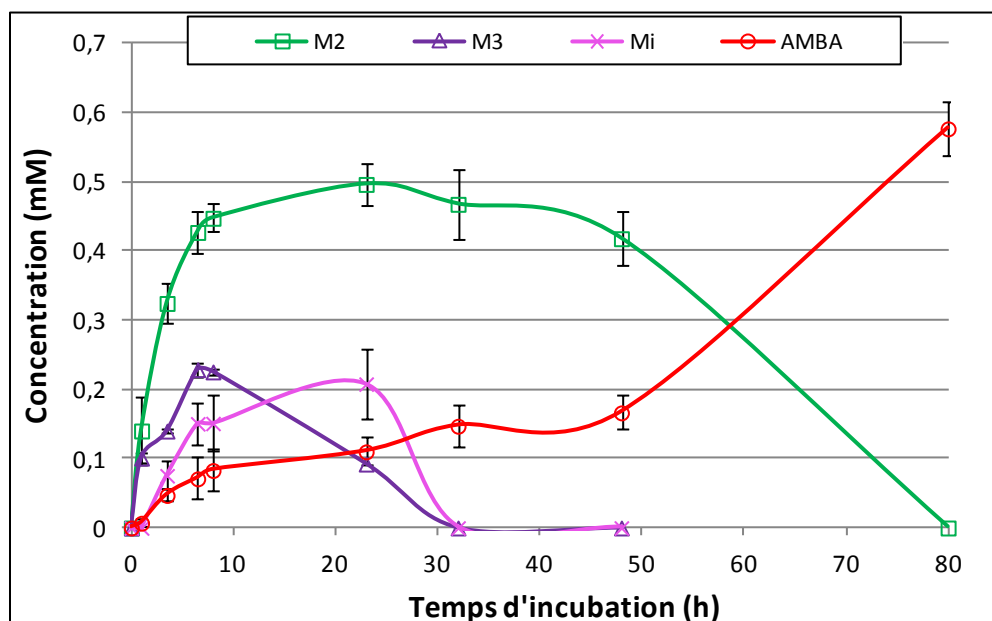


Figure 51 : Evolution de la concentration du métabolite inconnu (Mi) et des autres métabolites lors de la biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus sp. IB11* (3 cultures indépendantes)

Il faut noter que le métabolite inconnu **Mi** n'apparaît qu'après 3,5h d'incubation, soit après les métabolites **M2** et **M3** qui sont détectés après 1h, laissant penser qu'il pourrait être issu de ces métabolites comme l'AMBA. Cependant, sa formation rapide ne correspond pas à un effet significatif sur les cinétiques de ces deux métabolites. Sa concentration augmente pour atteindre un maximum après 23h, en même temps que **M2**. Après 32h, **Mi** et **M3** disparaissent et la concentration de **M2** commence à diminuer, alors que celle de l'**AMBA** augmente. Il est donc difficile de situer le métabolite **Mi** dans le schéma métabolique.

II.3.2 Souches de *Bacillus sp.* ne dissipant que partiellement la mésotrione dans nos conditions d'expérience

Nous avons effectué la même analyse sur les expériences de biodégradation de la mésotrione 1 mM réalisées avec les trois souches de *Bacillus sp.* ne la dissipant pas totalement : *Bacillus sp. IB1*, *Bacillus sp. IB13* et *Bacillus sp. 7B11*. Pour rappel, ces souches biotransforment, dans nos conditions, de 50 à 70% de la mésotrione après 5 jours d'incubation.

Les études qualitatives et quantitatives sur l'évolution des métabolites donnent des résultats relativement similaires à ceux obtenus précédemment. Les métabolites **M2** et **M3**,

ainsi que l'**AMBA** sont retrouvés, dans des proportions plus faibles que précédemment du fait de la biodégradation plus lente et incomplète de la mésotrione, à part pour la souche *Bacillus* sp. IB13 pour laquelle le métabolite **M3** n'est pas détecté (Figure 52). Toutefois, la concentration de **M2** est toujours beaucoup plus importante que celle de **M3**. Enfin, aucune de ces souches n'a conduit à la formation, même transitoire, du métabolite **M4**.

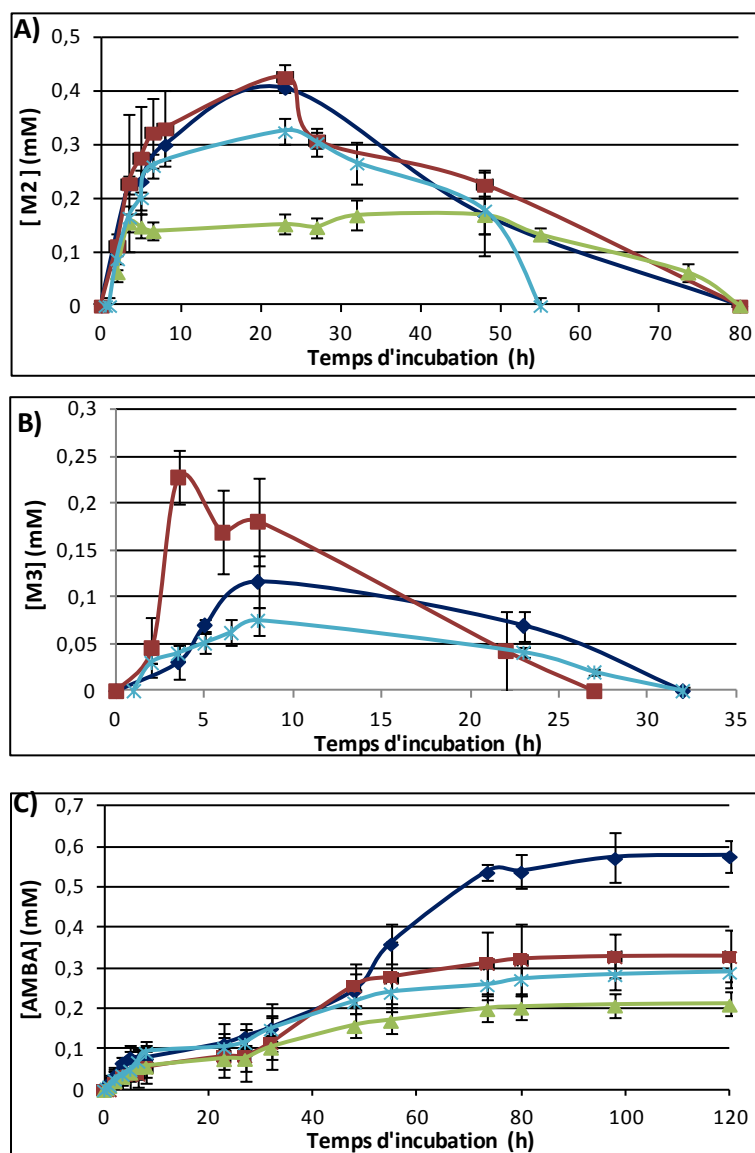


Figure 52 : Cinétiques d'évolution des métabolites de la mésotrione lors de sa biodégradation par (◆) *Bacillus* sp. 3B6, (■) *Bacillus* sp. IB1, (▲) *Bacillus* sp. IB13 et (*) *Bacillus* sp. 7B11. (A) Métabolite M2 ; (B) Métabolite M3 et (C) AMBA (2 à 5 réplicats suivant la souche)

Là encore, le métabolite inconnu (**Mi**) a pu être mis en évidence avec la souche *Bacillus* sp. IB1 par analyses RMN ^1H (Figure 53). Sa concentration reste plus faible qu'avec IB11 du fait sans doute, de la moins forte biodégradation de la mésotrione. De plus, le

maximum de concentration est obtenu après 8h d'incubation (0,14 mM) et une disparition totale de **Mi** est observée après 23h tandis que **M3** persiste.

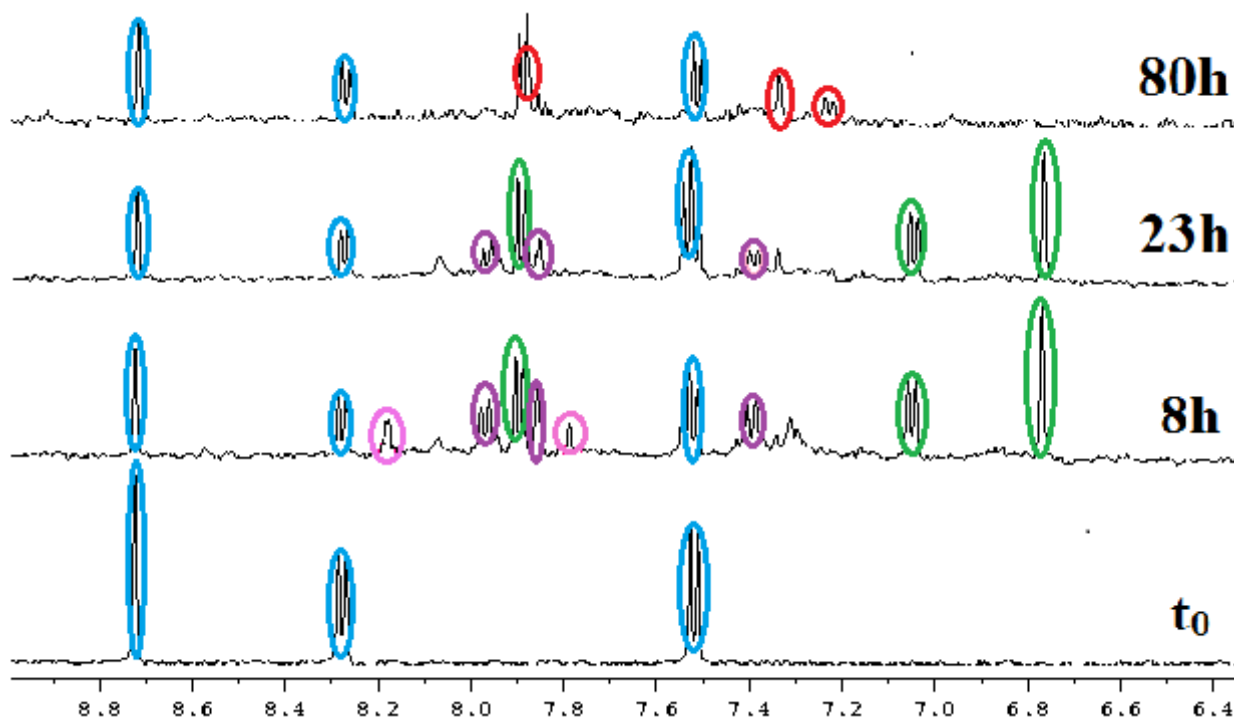


Figure 53 : Suivi par RMN ^1H de la cinétique de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Bacillus* sp. IB1. Mésotrione (bleu), AMBA (rouge), M2 (vert), M3 (mauve) et Mi (rose)

II.3.3 Conclusion sur les souches de *Bacillus* sp.

Les métabolites trouvés lors de la biotransformation de la mésotrione 1 mM avec les nouvelles souches de *Bacillus* sp. isolées sont les mêmes que ceux trouvés avec la souche *Bacillus* sp. 3B6 et déjà identifiés par Durand *et al.* [2007]. Un schéma métabolique commun peut donc être proposé avec une étape initiale clef correspondant à la réduction du groupement nitro de la mésotrione (**M2**) et conduisant, après cyclisation, à un dérivé isoxazolol (**M3**). Par contre, la déshydratation abiotique observée avec la souche de référence *Bacillus* sp. 3B6 et conduisant à l'isoxazole (**M4**) n'a été observée qu'avec une seule autre souche (IB4) et un nouveau métabolite inconnu (**Mi**) a été repéré avec deux de ces souches (IB1 et IB11). Il semble donc qu'un schéma métabolique de biodégradation de la mésotrione commun (avec quelques variantes intermédiaires) puisse être établi avec l'ensemble de ces souches de *Bacillus*, les cinétiques d'évolution des métabolites variant avec celle de la mésotrione (Figure 54).

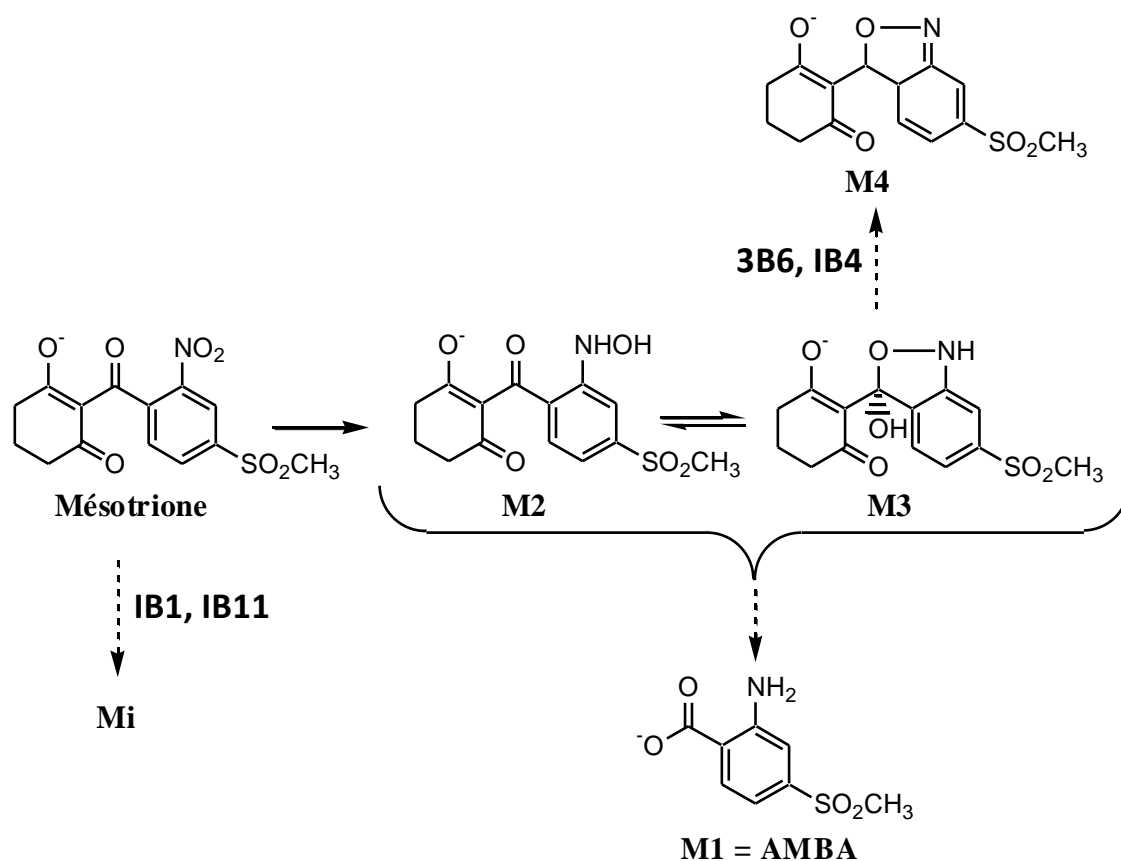


Figure 54 : Schéma métabolique proposé pour la biodégradation de la mésotrione par différentes souches de *Bacillus* sp.

Une analyse quantitative comparée de l'évolution des différents métabolites avec les différentes souches de *Bacillus* sp. testées est présentée sur la Figure 55.

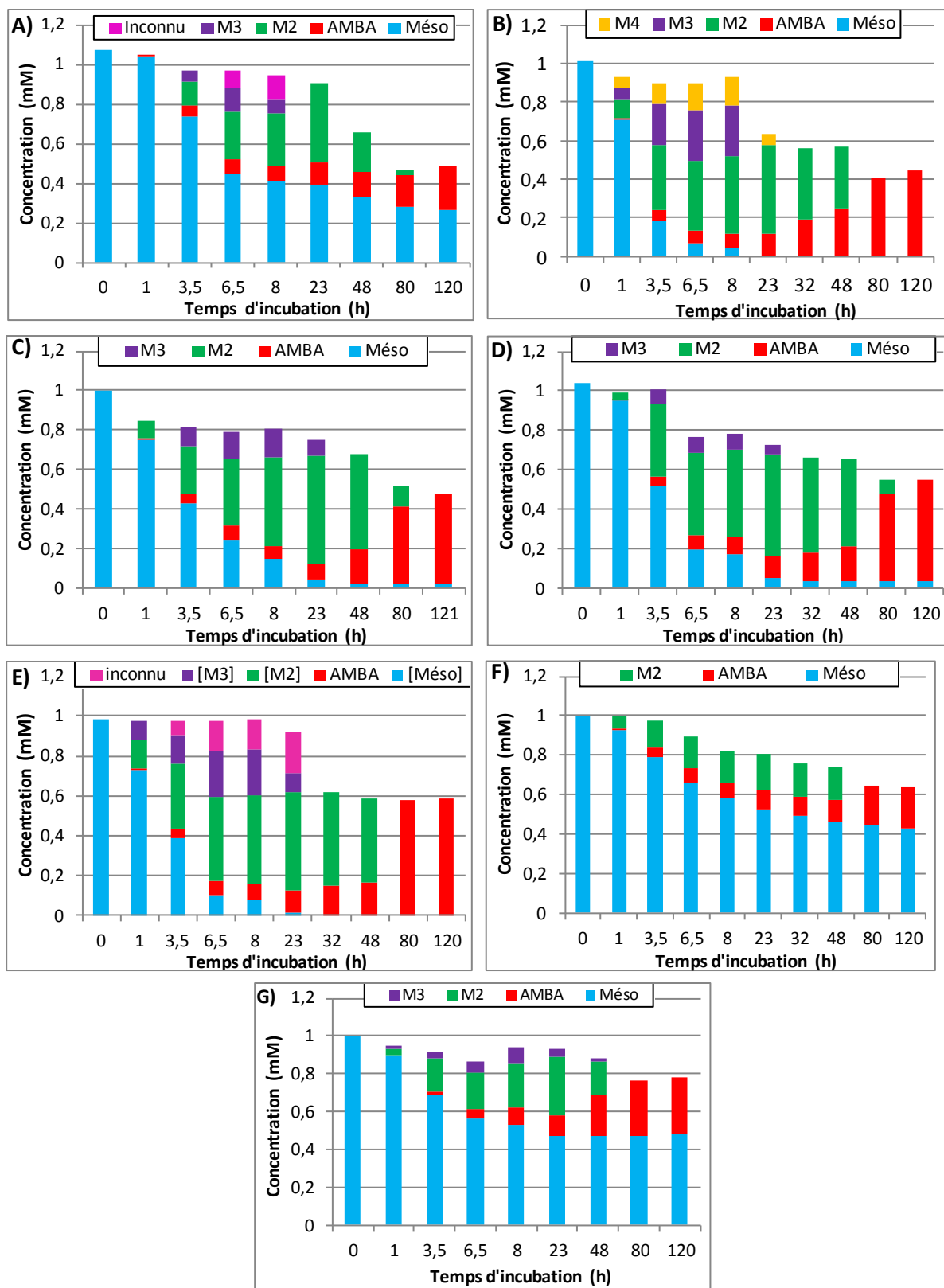


Figure 55 : Bilan quantitatif global obtenu par RMN ^1H lors de la biodégradation de la mésotrine 1 mM par les souches *Bacillus* sp. (A) IB1, (B) IB4, (C) IB8, (D) IB10, (E) IB11, (F) IB13 et (G) 7B11

Différentes remarques peuvent être faites :

- Le métabolite **M2** est toujours le métabolite majoritaire quelle que soit la souche entre 1h et 48h d'incubation et l'**AMBA** reste le métabolite terminal, qui s'accumule, dans tous les cas. Les métabolites **M3**, **M4** et **Mi** apparaissent en concentrations plus faibles (voire nulles) et de manière intermédiaire.
- Avec toutes les souches, excepté *Bacillus* sp. 7B11, une disparition de 40 à 60% de matière est constatée après 5 jours d'incubation, la concentration d'AMBA retrouvée ne correspondant pas à celle de mésotrine initiale (comme pour *Bacillus* sp. 3B6). Par conséquent, environ la moitié de la mésotrine doit être minéralisée, ou convertie en d'autres métabolites non détectés dans le milieu par nos méthodes d'analyse car adsorbés sur les cellules, internalisés ou instables, et ce quelle que soit l'efficacité de la souche vis-à-vis de la mésotrine.

II.4. Etude comparative du comportement des métabolites lors de la biotransformation de la mésotrine pure par *Escherichia coli* ATCC 11303 et *Pantoea* sp. 5B12

Afin de déterminer si ce schéma métabolique pouvait être généralisable à d'autres souches, nous avons effectué les mêmes analyses sur les métabolites obtenus avec les deux autres souches dégradantes testées précédemment, à savoir *Escherichia coli* ATCC 11303 et *Pantoea* sp. 5B12, qui biotransforment la mésotrine, dans nos conditions, à 20 et 50% respectivement.

Avec ces deux souches, les métabolites **M2** et **M3** sont retrouvés, ainsi que l'**AMBA** comme métabolite terminal. Là encore, le métabolite **M4** n'a pas été détecté, ni par HPLC, ni par RMN ^1H , même de manière intermédiaire. Pour ces deux souches, le même métabolite inconnu (**Mi**) est observé par RMN ^1H (Figure 56).

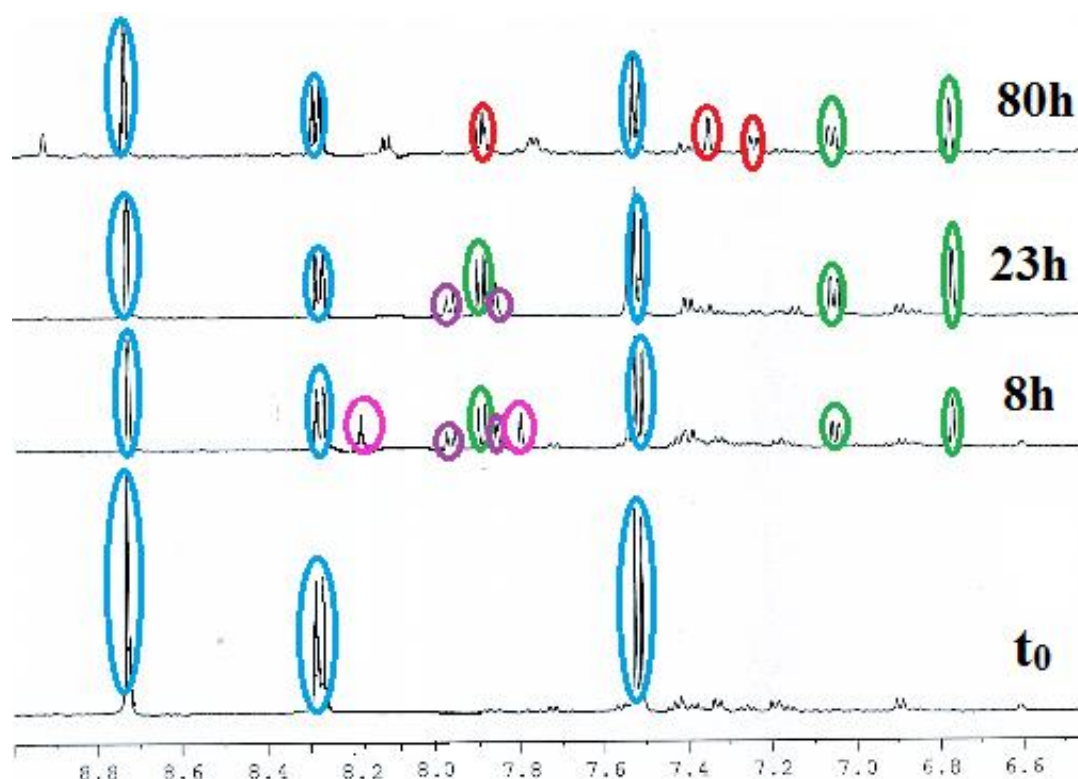


Figure 56 : Suivi par RMN ^1H de la cinétique de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *E. coli* ATCC 11303. Mésotrione (bleu), AMBA (rouge), M2 (vert), M3 (mauve) et Mi (rose)

En termes de cinétique d'apparition et de disparition par rapport aux autres métabolites, **Mi** apparaît après 2h d'incubation, mais suit dans son évolution, une allure similaire à **M3** jusqu'à 8h d'incubation (0,15 mM). Ensuite **Mi** disparaît totalement tandis que **M2** et **M3** augmentent davantage. Il faut noter que durant la disparition de **Mi**, la concentration de l'**AMBA** augmente (Figure 57).

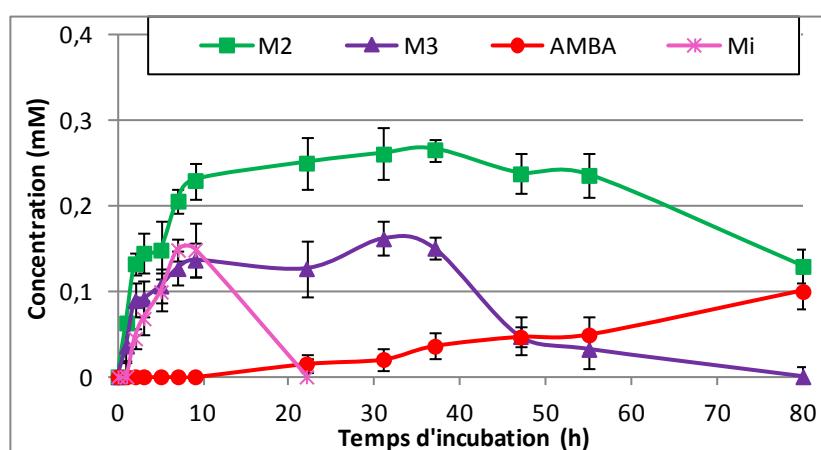


Figure 57 : Evolution de la concentration du métabolite inconnu (Mi) et des autres métabolites lors de la biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *E. coli* ATCC 11303 (2 cultures indépendantes)

Avec la souche *Pantoae* sp. 5B12, **Mi** est observé mais en concentration assez faible. Il apparait après 7h d'incubation, atteint son maximum à 22h (0,05 mM) et disparaît après 48h (Figure 58).

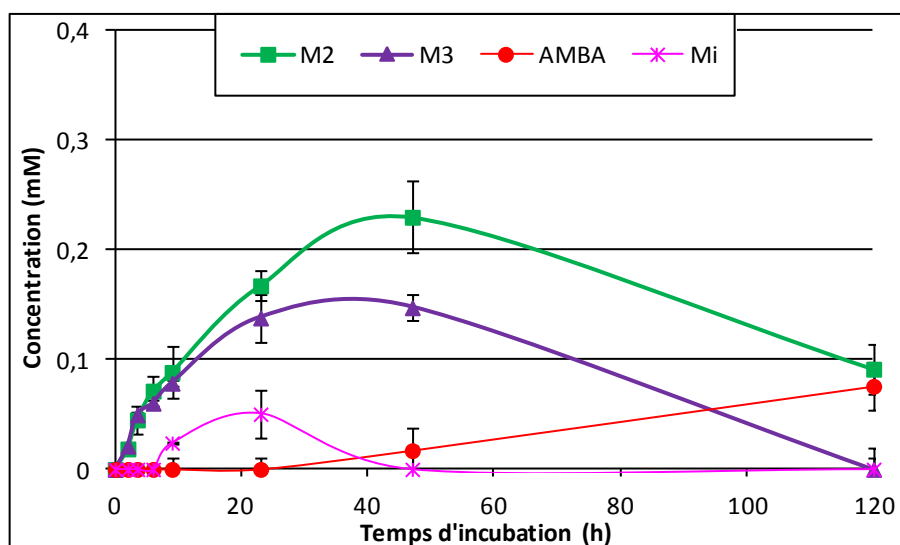


Figure 58 : Evolution de la concentration du métabolite inconnu (Mi) et des autres métabolites lors de la biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Pantoae* sp. 5B12 (2 cultures indépendantes)

Une analyse quantitative comparée de l'évolution des différents métabolites avec les deux souches Gram négatif testées, *E. coli* ATCC 11303 et *Pantoae* sp. 5B12 est présentée sur la Figure 59. La perte de matière est d'environ 35-40% après 120h d'incubation. Cependant, la faible et lente dégradation de la mésotrione dans le cas de ces souches aboutit à la présence plus longue de **M3** (jusqu'à 55h) et de **M2** (120h), ce dernier étant cependant en diminution. Nous pouvons supposer que comme avec les autres souches, l'**AMBA** restera le seul métabolite qui s'accumule.

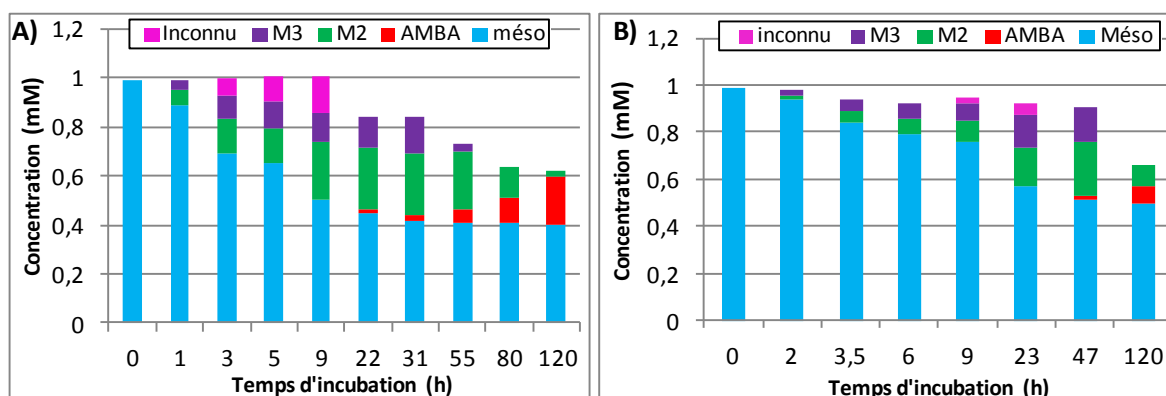


Figure 59 : Bilan quantitatif global obtenu par RMN ^1H lors de la biodégradation de la mésotrione 1 mM par les deux souches Gram négatif, (A) *E. coli* ATCC 11303 et (B) *Pantoea* sp. 5B12

II.5. Conclusion

Toutes les souches bactériennes dégradantes testées, Gram positif comme Gram négatif, donnent les mêmes métabolites : **M2** (métabolite intermédiaire majoritaire), **M3** (métabolite intermédiaire) et l'**AMBA** (métabolite terminal) quel que soit le taux de biodégradation de la mésotrione. Par contre, le métabolite **M4** identifié précédemment comme un autre métabolite final avec *Bacillus* sp. 3B6, n'a été observé qu'avec *Bacillus* sp. IB4, et ce de manière transitoire, mais en concentration plus importante. Plusieurs souches ont conduit à un métabolite inconnu (**Mi**), qui apparait en quantité plus ou moins importante (0,05-0,3 mM) selon les souches après quelques heures d'incubation, et disparaît rapidement (22-48h). L'évolution de ce métabolite ne donne pas de renseignement clair sur son origine.

En conclusion, le schéma métabolique proposé pour la dégradation de la mésotrione par les souches de *Bacillus* peut être généralisé en incluant des souches Gram négatif qui, certes ont une efficacité moindre dans la transformation de cet herbicide, mais conduisent aux mêmes métabolites (Figure 60).

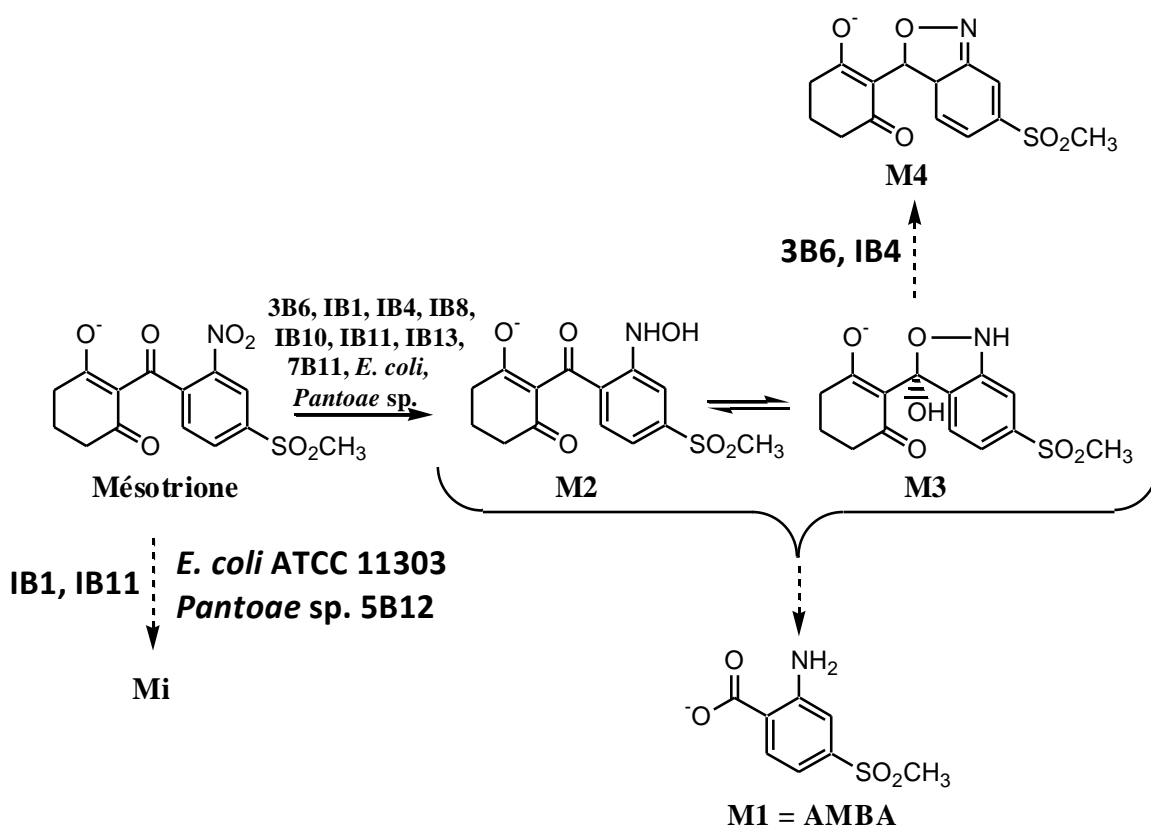


Figure 60 : Schéma métabolique proposé pour la biodégradation de la mésotrione par les souches bactériennes étudiées

III. Essai d'identification du métabolite inconnu observé lors de la biodégradation de la mésotrione pure par LC/MS et RMN 2D

Pour rappel, les analyses par RMN ^1H de ce métabolite inconnu **Mi** ont montré la présence de 2 signaux dans la zone des aromatiques : deux doublets à 7,80 et 8,18 ppm intégrant pour le même nombre de protons (Figure 61).

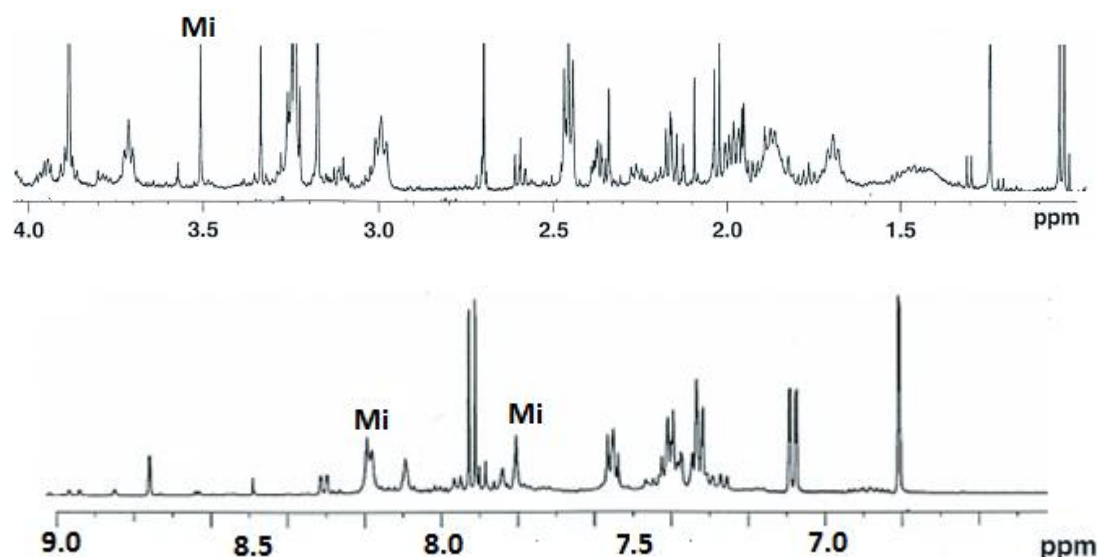


Figure 61 : Spectre RMN ^1H (zones des aliphatique en haut et des aromatiques en bas) d'un surnageant de biodégradation (T + 13h)

Un seul nouveau signal (singulet) est observé dans la zone des aliphatiques, tous les autres signaux de cette zone pouvant être attribués aux métabolites déjà identifiés ou aux métabolites endogènes. Ce singulet résonne à 3,52 ppm et intègre pour trois fois le nombre de protons des deux signaux précédents. Il pourrait être attribué au groupement $-\text{CH}_3$ du SO_2CH_3 .

Il semble donc *à priori*, par rapport à la mésotrine et aux autres métabolites déjà identifiés, qu'il ne reste plus que deux protons sur le noyau aromatique, et que la partie cyclohexanedione soit clivée. D'autre part, au regard des cinétiques, **Mi** apparaît toujours après les métabolites **M2** et **M3**. Il pourrait donc provenir de cette voie métabolique.

III.1. Analyses par LC/ESI-MS

Plusieurs échantillons, correspondants à différents temps d'une cinétique de biodégradation avec *Bacillus* sp. IB11 et *Escherichia coli*, ont été analysés par LC/(+)-ESI-MS accompagnés de témoins « cellules » réalisés dans les mêmes conditions. Aucun nouveau signal (différent des métabolites déjà identifiés ou des métabolites endogènes) n'a été détecté en masse et il n'a donc pas été possible d'avoir des informations sur sa structure par cette méthode. Il semble que notre métabolite ne soit pas ionisable dans les conditions utilisées (Cf. partie Matériels et Méthodes).

III.2. Analyses par RMN 2D

Nous avons donc réalisé un essai quantitatif de biodégradation de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. IB11, qui a été arrêté au maximum de concentration de **Mi**, soit après 23h d'incubation. A ce temps, il ne reste plus de mésotrione, le métabolite **M2** est à une concentration quasi maximale (0,4 mM), et **M3** commence à disparaître (0,16 mM). L'AMBA commence à s'accumuler (0,11 mM). Après concentration en utilisant un Speed-Vac et reprise dans D₂O, l'échantillon concentré a été analysé par différentes techniques de RMN 2D pour essayer d'obtenir des informations structurales sur **Mi** :

Remarque : Dans les expériences de RMN 2D suivantes, nous présentons uniquement la zone des aromatiques car le singulet à 3,52 ppm ne corrèle ni avec des protons, ni avec des carbones de la zone aromatique, ce qui pourrait corroborer qu'il s'agit du groupement CH₃ du sulfonyle (distance trop longue pour pouvoir visualiser une corrélation).

- Expérience TOCSY ¹H-¹H (Total Correlation SpectroscopY) : cette séquence 2D homonucléaire permet de corréler les signaux ¹H couplés scalairement et d'identifier tous les signaux ¹H appartenant à une même molécule (même réseau de spins).

Deux tâches de corrélation ont été observées pour le métabolite inconnu entre les deux signaux à 7,80 ppm et 8,18 ppm, ce qui prouve que ces deux protons appartiennent bien à la même molécule (Figure 62).

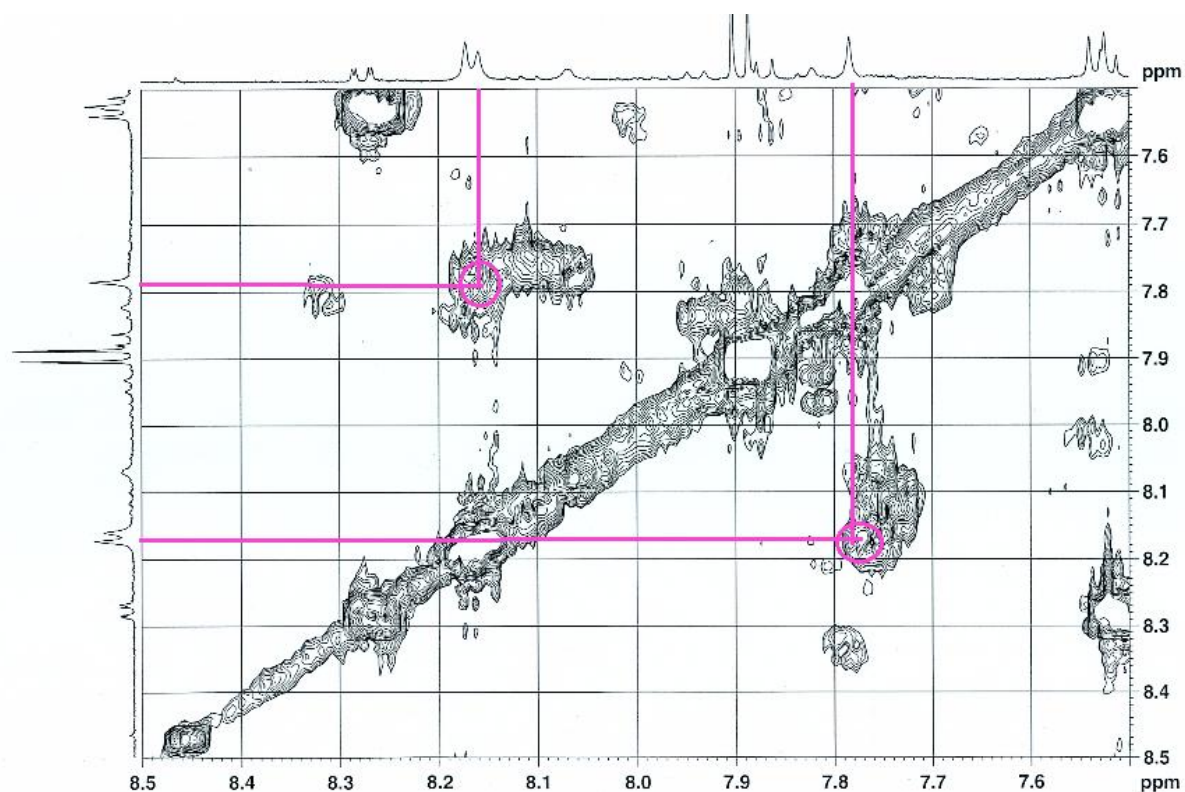


Figure 62 : Expérience TOCSY ^1H - ^1H enregistrée sur un surnageant de biodégradation (T0 + 13h)

- Expériences COSY ^1H - ^1H et NOESY ^1H - ^1H : la COSY est une séquence 2D homonucléaire qui permet de corréler les signaux de protons couplés scalairement et elle permet donc de visualiser les constantes de couplage 3J entre 2 protons voisins. La NOESY permet de corréler des protons par interaction dipolaire entre deux spins géométriquement proches (effet Overhauser nucléaire ou eOn). Notons que les corrélations ne sont plus visibles au delà de 5Å. Les mêmes corrélations entre les deux signaux du métabolite **Mi** sont présentes dans ces deux expériences (Figure 63).

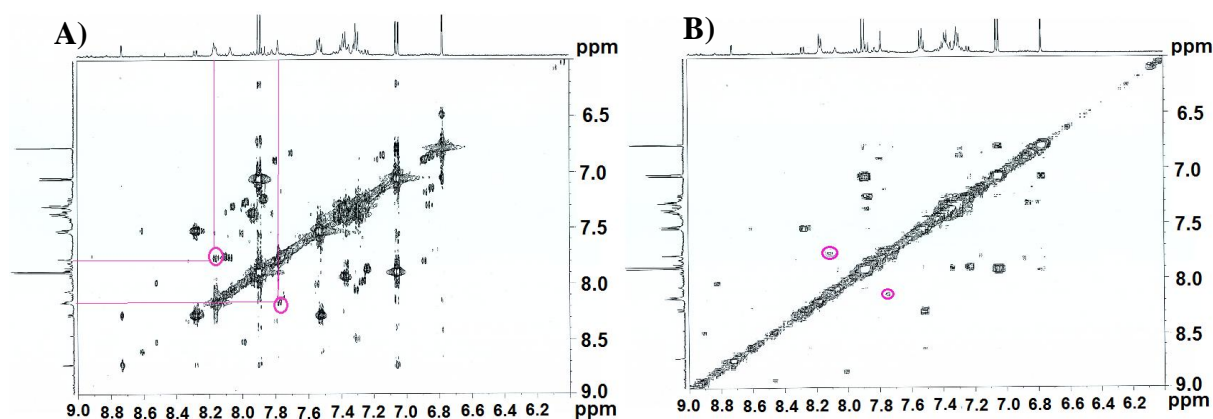


Figure 63 : (A) COSY ^1H - ^1H et (B) NOESY ^1H - ^1H d'un échantillon de biodégradation de la mésotrine 1 mM (T0 + 13h)

L'ensemble de ces expériences montre que ces deux protons sont, scalairement et proches dans l'espace, et qu'ils sont donc portés par deux carbones adjacents. Aucune autre corrélation n'est visible confirmant qu'il n'y a bien que ces deux protons sur le noyau aromatique. Sachant qu'il est issu de la mésotrione, la structure du métabolite inconnu proposée est donc la suivante (Figure 64) :

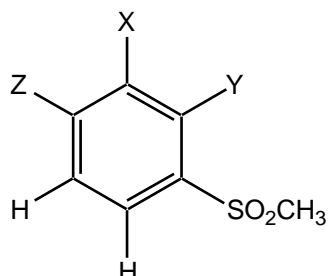


Figure 64 : Hypothèse de structure du métabolite inconnu

Afin de corréler les protons avec les carbones correspondants, une expérience HMQC ^1H - ^{13}C a été réalisée (Figure 65). Elle permet de corréler chaque proton avec le carbone le portant (constante de couplage $^1J_{\text{H,C}}$).

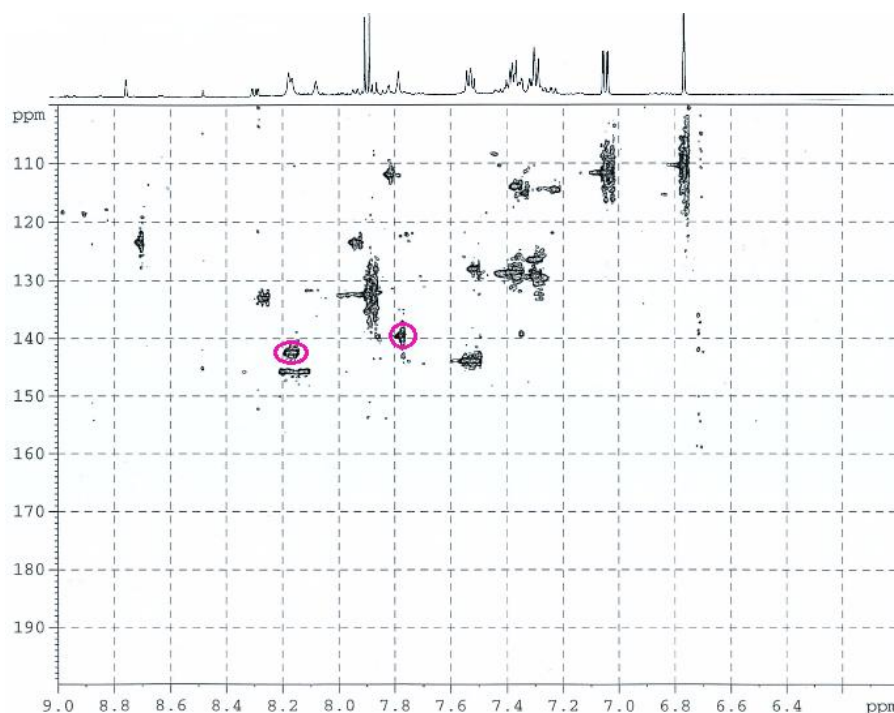


Figure 65 : HMQC ^1H - ^{13}C d'un échantillon de biodégradation de la mésotrione 1 mM (T0 + 13h)

La Figure 65 montre une corrélation entre le proton résonnant à 7,80 ppm avec un carbone résonnant à 140 ppm et le proton à 8,18 ppm avec un carbone résonnant à 143 ppm, deux carbones appartenant bien à la zone des aromatiques.

Des renseignements supplémentaires sont recherchés en utilisant une expérience HMBC ^1H - ^{13}C (Figure 66) qui permet d'établir des corrélations hétéronucléaires pour des couplages à plus longue distance (plusieurs liaisons).

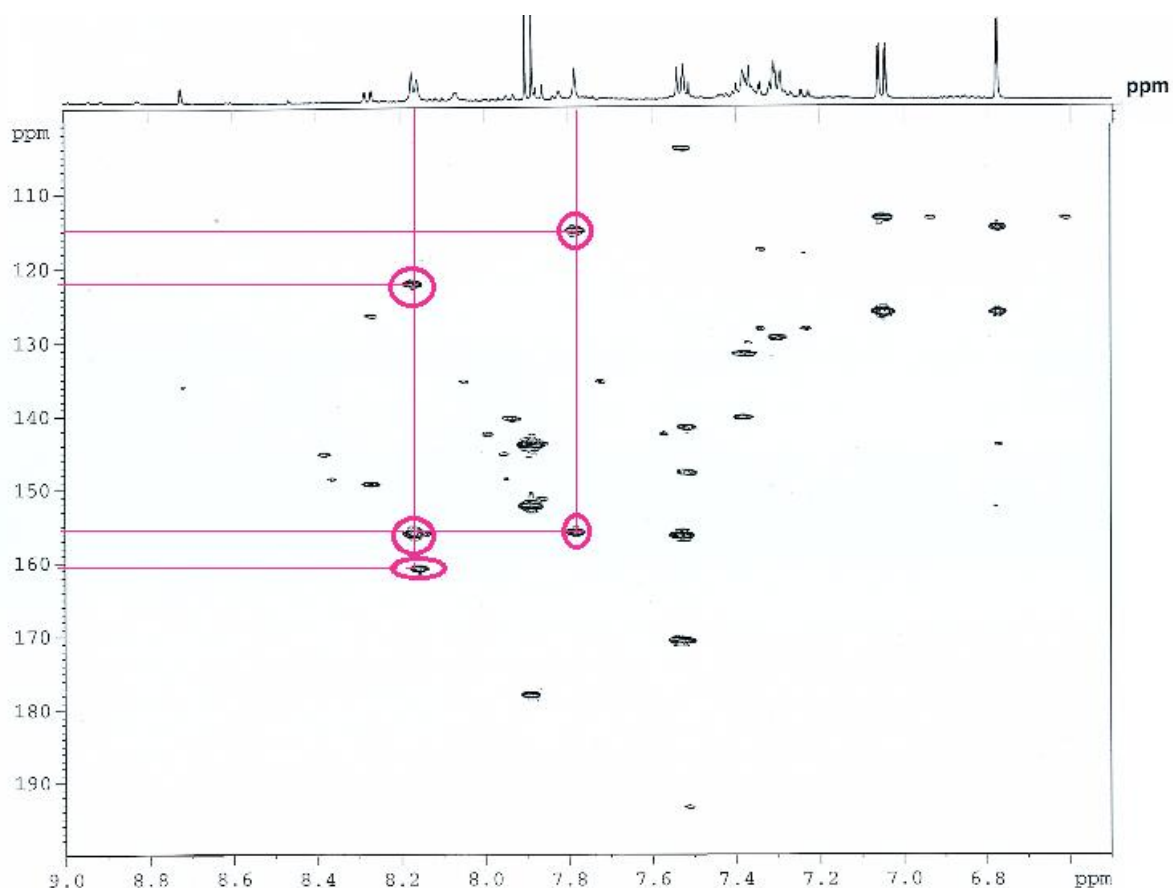


Figure 66 : HMBC ^1H - ^{13}C d'un échantillon de biodégradation de la mésotrione 1 mM (T0 + 13h)

Plusieurs tâches de corrélation sont observées pour chaque proton :

- pour le proton résonnant à 8,18 ppm, 3 tâches de corrélation sont observées avec des carbones résonnant à 122,0 ; 154,2 et 160,5 ppm.
- Pour le proton résonnant à 7,80 ppm, 2 tâches de corrélation sont observées avec des carbones résonnant à 114,8 et 154,2 ppm.

Nous pouvons remarquer donc que les deux protons corrélient avec le même carbone (154,2 ppm) qui est un carbone de la zone aromatique. Le carbone résonnant à 160,5 ppm est un carbone aromatique avec un groupement électro-attracteur (du type COOH).

III.3. Hypothèses sur la structure du métabolite inconnu Mi

D'après les données des différentes expériences de RMN, nous pouvons déduire que la structure du métabolite inconnu est un cycle aromatique (déplacements chimiques des protons), ayant perdu la partie cyclohexanedione (un seul signal dans la zone des aliphatiques correspondant au méthyle du groupement sulfonylméthyle) et tétrasubstitué. Les deux protons aromatiques sont portés par des carbones adjacents. Ce métabolite semble donc avoir une structure relativement similaire à celles de l'AMBA ou du MNBA, mais avec une substitution en position 3. L'absence de pics dans la zone des aliphatiques (clivage de la partie cyclohexanedione) favorise l'hypothèse qu'un des substituants est le groupement -COOH. Cet acide carboxylique pourrait être porté par le carbone résonnant à 160,5 ppm, corrélé avec le proton à 8,18 ppm (HMBC ^1H - ^{13}C , Figure 66). La structure du métabolite inconnu pourrait donc être du type (Figure 67) :

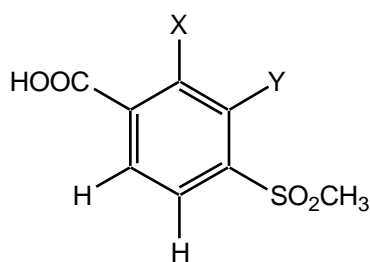


Figure 67 : Hypothèse de structure de Mi

Dans la littérature, la biodégradation biologique des dérivés aromatiques nitrés peut suivre deux voies principales [Marvin-Sikkema et de Bont, 1994 ; Ye *et al.*, 2004 ; Arora *et al.*, 2012]:

- **Oxydation du cycle aromatique** dans une réaction catalysée soit par une dioxygénase avec introduction simultanée de deux groupements hydroxyles, soit par une monooxygénase avec introduction d'un seul groupement hydroxyle et élimination ou non du groupement nitro. Cette voie de biodégradation de nitrobenzènes a été mise en évidence chez différentes souches bactériennes : *Comamonas acidovorans* NBA-10 [Nishino et Spain, 1995] ; *Pseudomonas* sp. JS42 [Haigler *et al.*, 1994] ; *Micrococcus* sp. [Mulla *et al.*, 2011]. Cette première stratégie pourrait conduire à un dérivé du catéchol (X = Y = OH sur la Figure 67) (Figure 68).

• **Réduction du groupement nitro** en fonction hydroxylamine *via* un intermédiaire nitroso. Cette hydroxylamine peut ensuite être transformée soit en amine (cette voie a déjà été mise en évidence lors de la biodégradation de la mésotrione par *Bacillus* sp. 3B6), soit suite à un réarrangement enzymatique par une mutase du type réarrangement de Bamberger, conduire à des dérivés 1,2- ou 1,4-aminophénol [Schenzle *et al.*, 1999], soit grâce à une hydroxylaminobenzoate lyase conduire à un dérivé de catéchol [Marvin-Sikkema et De Bont, 1994] (Figure 68).

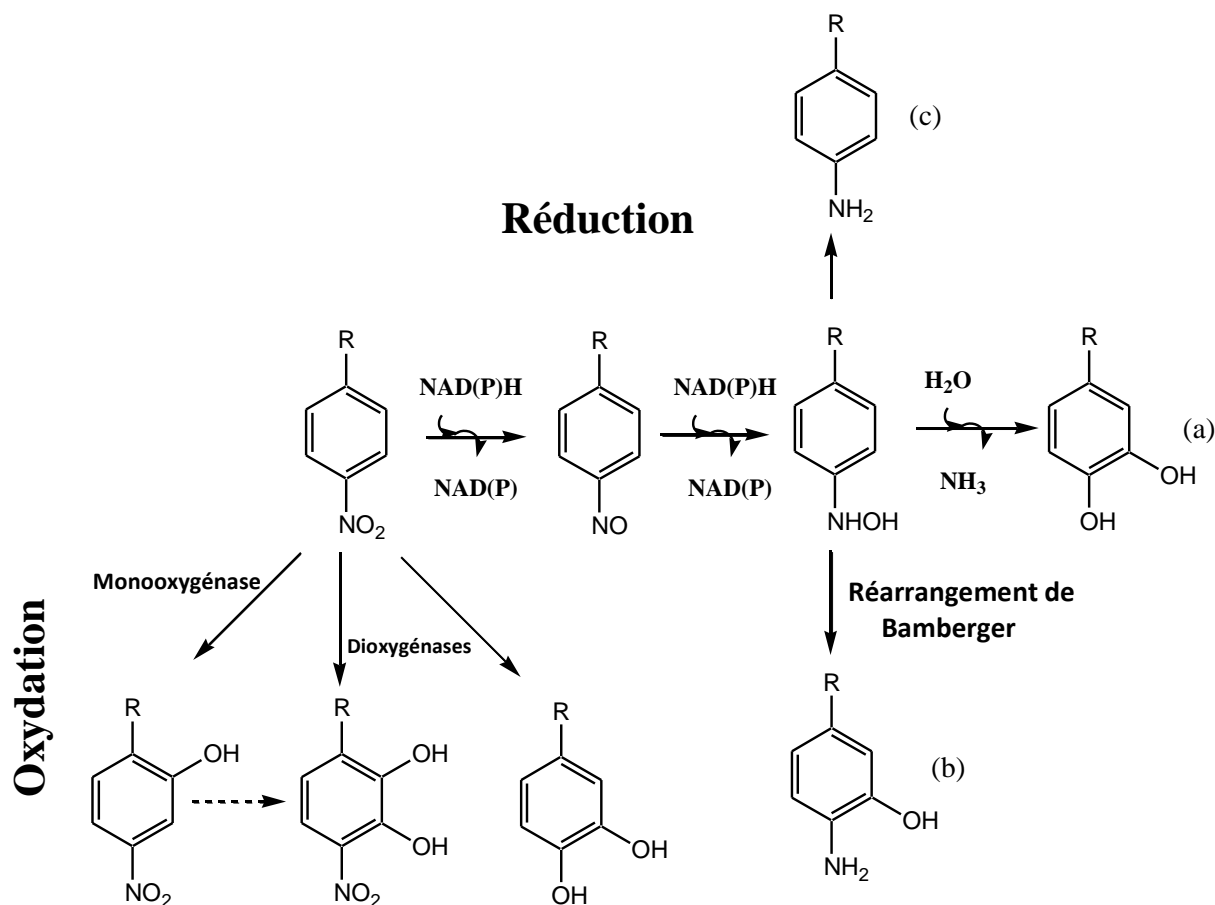


Figure 68 : Schéma récapitulatif des différentes voies de biodégradation des dérivés aromatiques nitrés par oxydation du cycle aromatique ou réduction du groupement nitro conduisant à (a) : un dérivé de catéchol, (b) un réarrangement de Bamberger ou (c) la réduction classique

Aucune étude n'a décrit la présence de ces différentes enzymes (monooxygénase ou dioxygénase, mutase, hydroxylaminobenzoate lyase) chez les souches de *Bacillus*, *E. coli* ou *Pantoea*, ce qui n'exclut pas leur présence. En combinant les données de la littérature et celles obtenues par RMN, nos hypothèses de structures pour **Mi** sont donc (Figure 69) :

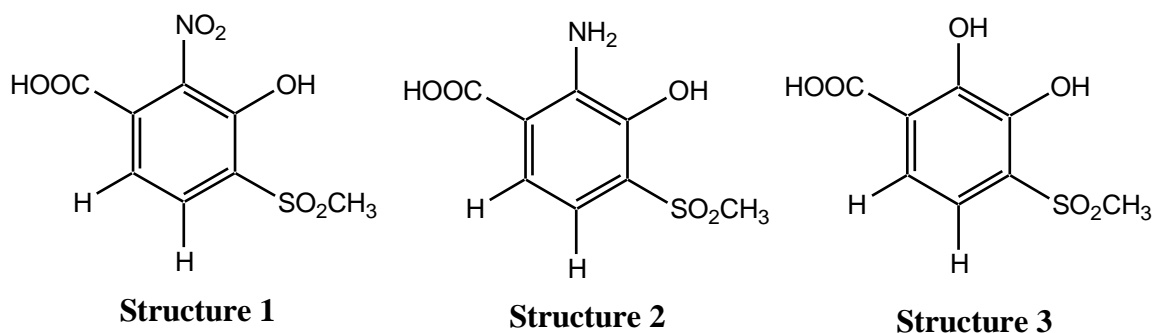


Figure 69 : Hypothèses de structures pour le métabolite inconnu

L'absence de standards pour ces structures nous amène à comparer avec des molécules connues afin de prédire, avec les déplacements chimiques des carbones et des protons, la structure la plus crédible. La comparaison avec les données de molécules similaires (sans le substituant $-\text{SO}_2\text{CH}_3$) est en faveur de la structure 2 (Figure 69) à cause des déplacements chimiques très déblindés des deux protons (7,80 et 8,18 ppm) et des carbones correspondants (140 et 143 ppm). L'étude des déplacements chimiques d'autres molécules ayant un substituant $-\text{SO}_2\text{CH}_3$, mais pas les mêmes groupements sur le cycle aromatique, montre que ce dernier « déblindé » les signaux des atomes voisins. Par conséquent, il est difficile de prédire sans ambiguïté laquelle de ces trois molécules est la plus probable.

Une molécule de structure très proche de l'hypothèse 2 pour notre métabolite inconnu et très étudiée est l'acide 3-hydroxy-4-méthylantranilique (Figure 70). Plusieurs auteurs ont pu mettre en évidence des réactions chimiques d'auto-oxydation de ce composé [Manthey *et al.*, 1988] ou des réactions enzymatiques catalysées par exemple par des laccases isolées de *Trametes versicolor* [Osiadacz *et al.*, 1999] conduisant à des dimères (Figure 70).

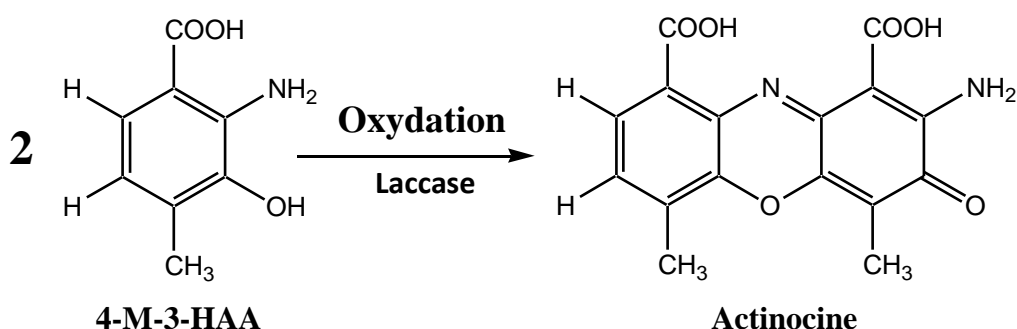
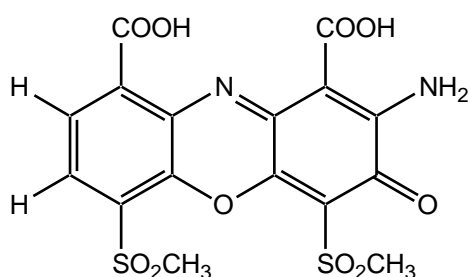


Figure 70 : Oxydation de l'acide 3-hydroxy-4-méthylantranilique (4-M-3-HAA) en actinocine (d'après Osiadacz *et al.*, 1999)

La comparaison des deux spectres RMN ^1H , avant et après dimérisation, montre une grande variation des déplacements chimiques des deux protons dans le cas du dimère, passant de 7,19 et 6,29 ppm à 7,44 et 7,14 ppm. Une quatrième possibilité de structure pour le métabolite inconnu pourrait correspondre à un dimère de la structure **2** (Figure 71). L'enzyme responsable de cette réaction (laccase) très répandue chez les plantes et les champignons a également été mise en évidence chez un grand nombre des souches bactériennes dont des souches de *Bacillus* sp. [Van Waasbergen *et al.*, 1996] et d'*E. coli* [Kim *et al.*, 2001]. Cette structure dimérique pourrait expliquer l'absence de réponse en spectrométrie de masse que nous avons obtenue.



Structure 4

Figure 71 : Structure dimérique possible proposée pour le métabolite inconnu

En conclusion, quatre structures chimiques possibles ont été proposées pour le métabolite inconnu observé lors de la biodégradation de la mésotrione par plusieurs des souches bactériennes testées. L'absence d'autres informations (surtout issues de la spectrométrie de masse) rend difficile le choix d'une de ces hypothèses. Des études plus approfondies (autres méthodes d'analyses, autres séquences de RMN) ou la synthèse de certaines des structures proposées pourrait nous permettre de trancher entre ces quatre hypothèses.

IV. Etude de l'effet de la formulation (Callisto®) sur la biodégradation de la mésotrione par les souches bactériennes dégradantes

En agriculture, ce ne sont pas les matières actives mais les matières formulées qui sont épandues. Nous avons donc voulu étudier l'effet de la formulation, et donc des adjuvants, sur la biodégradation de la mésotrione par les deux souches Gram positif les plus efficaces (*Bacillus* sp. 3B6 et IB11) (en termes de biodégradation), ainsi que par les deux souches Gram négatif dégradantes (*Escherichia coli* ATCC 11303 et *Pantoea* sp. 5B12). Pour ce faire, nous avons travaillé avec la formulation Callisto®, qui contient 100 g/L de mésotrione. D'après sa fiche de sécurité [Article 31, 1907/2006/CE], deux additifs présentant un caractère toxique sont décrits : l'octan-1-ol à 5-10 % W/W et le « poly(oxy-1,2-éthanediyl), α -isodecyl- ω -hydroxy » (= isodécyl alcool polyéthylène glycol ou PEO 10-6, CAS 61827-42-7) à 20-30 % W/W (sachant que la mésotrione représente 9% W/W) [Fiche sécurité Règlement (CE) No. 1907/2006] (Figure 72).

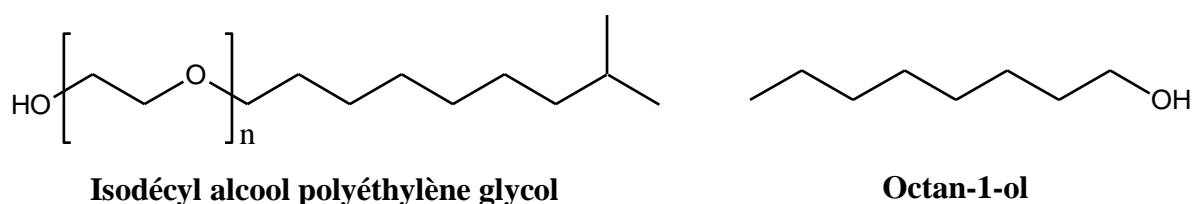


Figure 72 : Structure des deux additifs connus dans la formulation Callisto®

Un spectre RMN ^1H d'une solution de Callisto® (500 μM) est présenté sur la Figure 73 montrant la présence de nombreux signaux autres que ceux de la mésotrione. Ceux-ci peuvent donc être attribués aux additifs. Ils correspondent à des signaux de longue chaîne aliphatique : 0,8-0,9 ppm (CH_3), 1,2-1,5 ppm (CH_2), 1,6-1,8 ppm (CH) et ($\text{CH}_2\text{-C-OH}$ (ou OR)), 3,5-4,0 ppm ($\text{CH}_2\text{-O-}$). Les intégrations de ces pics montrent leur importante concentration dans la formulation Callisto® par rapport à la matière active.

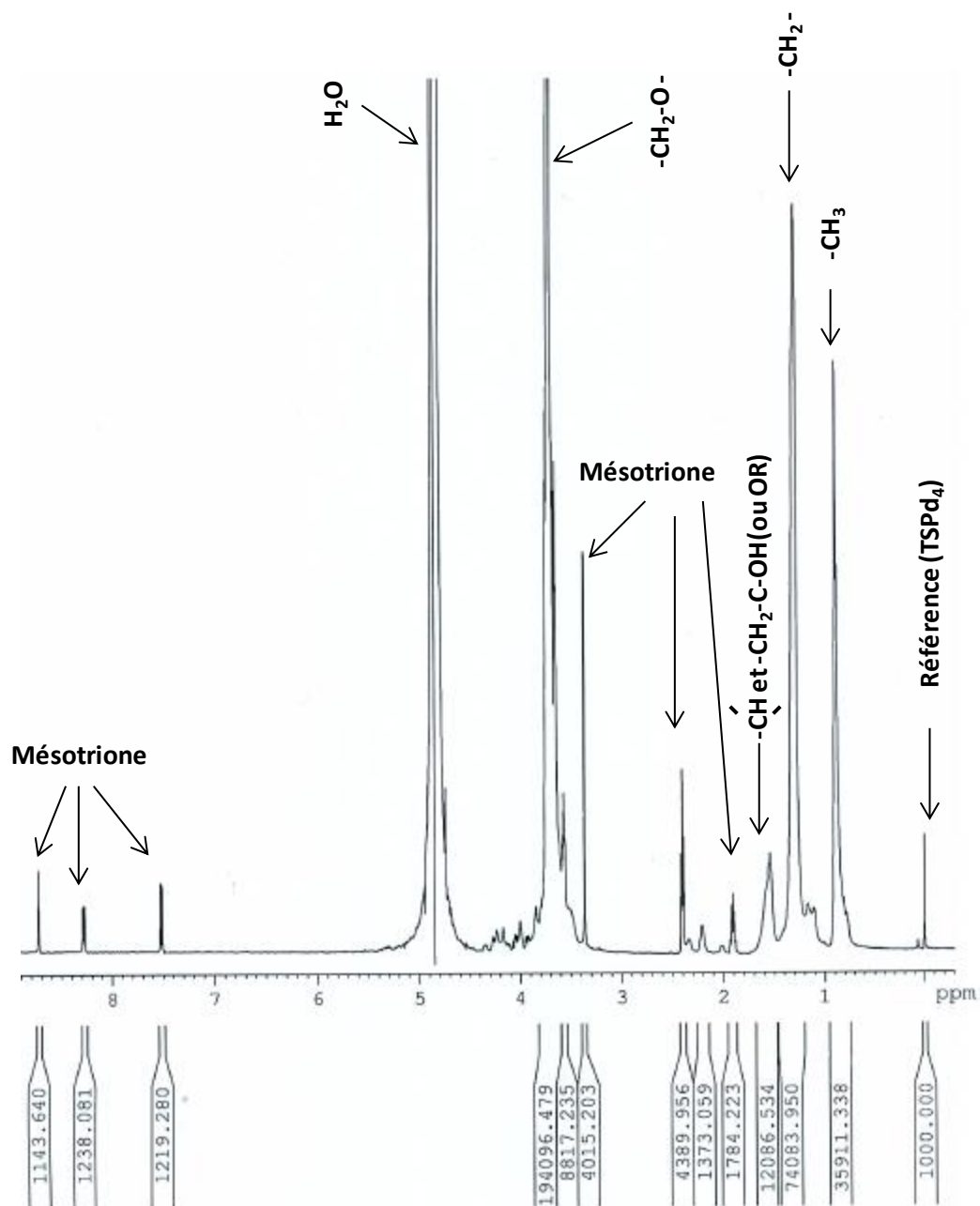


Figure 73 : Spectre RMN ¹H réalisé dans D₂O d'une solution de Callisto® contenant 500 µM de mésotrione

Dans la suite, les concentrations indiquées correspondent à des concentrations en matière active afin de pouvoir faire une comparaison directe entre mésotrione pure et formulée.

IV.1. Etude de la stabilité du Callisto® dans les conditions expérimentales choisies

Des premiers tests ont été réalisés pour vérifier la stabilité d'une solution de Callisto® à la lumière dans nos conditions d'incubation et lors de sa conservation au réfrigérateur. Ces tests ont montré une grande stabilité d'une solution de cette formulation : plus de deux mois au réfrigérateur et plus de 5 jours dans les incubateurs, à la lumière naturelle et à 27°C.

IV.2. Etude comparative de la biodégradation de la mésotrione pure et formulée par les souches de *Bacillus* sp.

Nous avons comparé la biodégradation de la mésotrione pure et formulée, à différentes concentrations, en termes de cinétiques et de voies métaboliques par deux souches dégradantes très efficaces.

IV.2.1 Biodégradation de la mésotrione pure et formulée par *Bacillus* sp. 3B6

Les cellules de *Bacillus* sp. 3B6 au repos métabolique sont incubées avec 3 concentrations faibles de mésotrione pure et de Callisto® en parallèle : 0,02, 0,12 et 0,18 mM (Figure 74). Une biodégradation totale au bout de quelques heures est observée pour toutes les concentrations et ce, avec les mêmes cinétiques pour la molécule pure (données non présentées) ou formulée. L'effet des additifs semble donc négligeable pour de faibles concentrations.

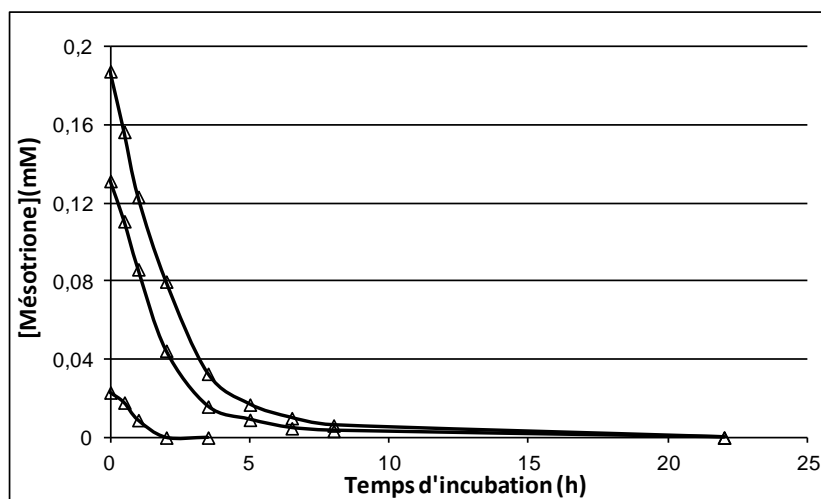


Figure 74 : Biodégradation par la souche *Bacillus* sp. 3B6 de la mésotrione formulée (Callisto®)   différentes concentrations

Nous avons donc testé une gamme de concentrations plus grandes (de 0,1   1 mM) tout en comparant avec des équivalents de la mésotrione seule (Figure 75). Les résultats montrent une augmentation de l'effet de la formulation avec la concentration. Les cinétiques de biodégradation de la mésotrione 0,1 mM seule et formulée sont similaires et pour 0,25 mM, un effet de ralentissement est observé avec la formulation. Cet effet inhibiteur est augmenté pour une concentration de 0,5 mM, le taux de biodégradation diminuant de 40 % pour la mésotrione formulée en fin d'incubation. L'inhibition est totale pour la biodégradation de 1 mM de Callisto®, alors que la mésotrione pure a totalement disparu au bout de 48h.

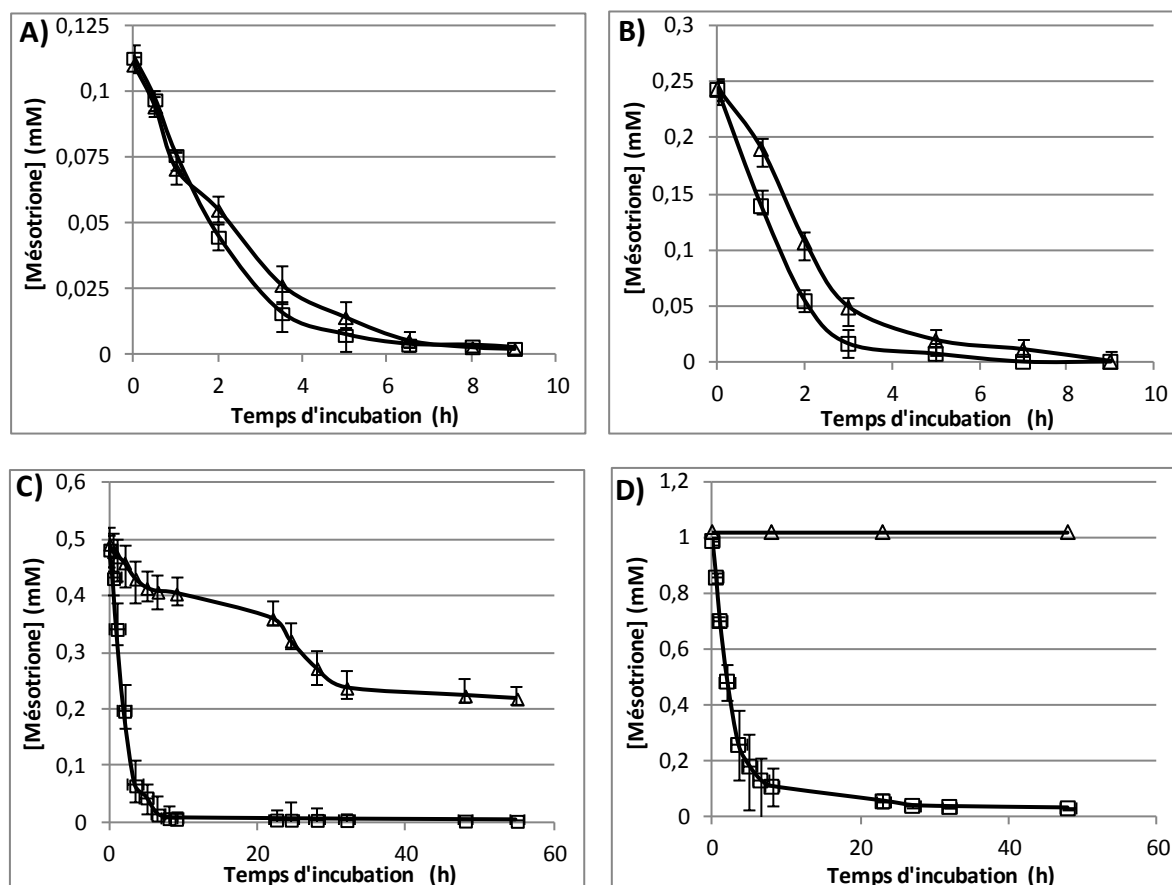


Figure 75 : Influence de la concentration des adjuvants (Callisto®) sur la biodégradation de la mésotrione (A : 0,1 ; B : 0,25 ; C : 0,5 et D : 1 mM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6. (□) Mésotrione pure, (△) Mésotrione formulée (3 cultures indépendantes)

Si les adjuvants ont un impact sur la cinétique de biodégradation, voire même ont un effet inhibiteur, le schéma métabolique de la mésotrione reste le même. Les métabolites, **M2**, **M3**, **M4** et l'**AMBA** apparaissent toujours lors de la biodégradation de la mésotrione formulée, avec des cinétiques, et donc des concentrations, dépendant de celle de disparition de la molécule mère. Par exemple, la concentration du métabolite **M3** (Figure 76B), qui apparaît lors de la biodégradation de la mésotrione 0,5 mM formulée, est 4 fois plus petite que celle observée avec la mésotrione pure. Les autres métabolites subissent aussi le même effet. Les métabolites **M2** et **AMBA** sont largement moins concentrés en présence de la formulation mais la diminution reste modérée en comparaison de celle de **M3** (plus de la moitié) (Figures 76A et C). Par conséquent, l'équilibre entre **M2** et **M3** est déplacé en faveur de **M2** sous l'effet de l'inhibition de la dégradation de la mésotrione formulée. Il peut s'agir d'un effet de pH lié à la présence des adjuvants, le pH mesuré étant toujours inférieur d'environ 0,2 unités de pH avec la formulation.

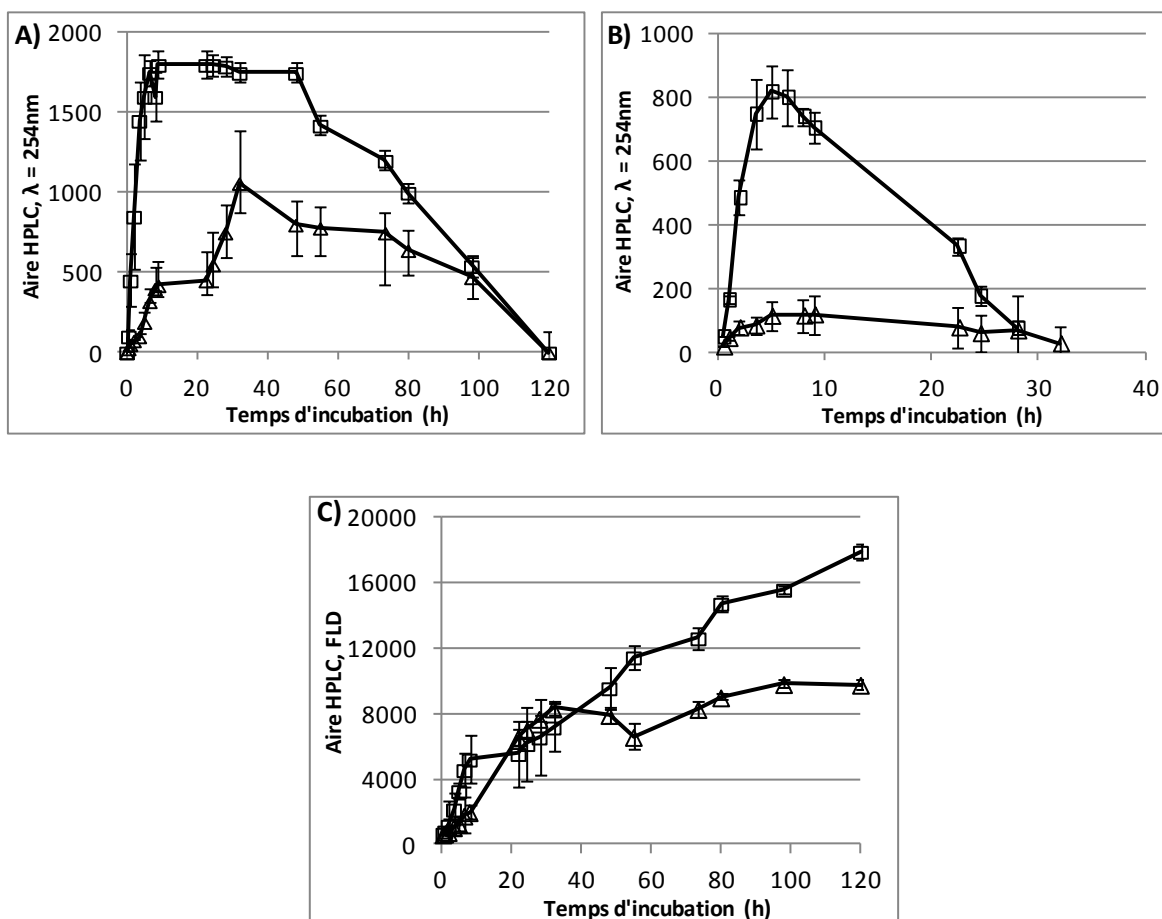


Figure 76 : Influence de la formulation (Callisto®) sur l'apparition des métabolites M2 (A), M3 (B) et AMBA (C) au cours de la biodégradation de la mésotrione 0,5 mM par la souche *Bacillus* sp. 3B6. (□) Mésotrione pure, (△) Mésotrione formulée (3 cultures indépendantes)

IV.2.2 Biodégradation de la mésotrione pure et formulée par *Bacillus* sp. IB11

La deuxième souche testée est *Bacillus* sp. IB11, qui dégrade très efficacement la mésotrione pure. Là encore, pour une concentration de 0,1 mM de mésotrione (Figure 77A), la formulation n'a aucun effet et elle présente un caractère inhibiteur peu significatif pour une concentration de 0,25 mM (Figure 77B) en mésotrione mais quasi-total pour une concentration de 0,5 mM (Figure 77C). Le taux de biodégradation n'atteint alors que 20% tandis qu'il est de 100 % pour la matière active pure (Figure 77C). Enfin, aucune dégradation n'est observée avec le Callisto® 1 mM (non présenté).

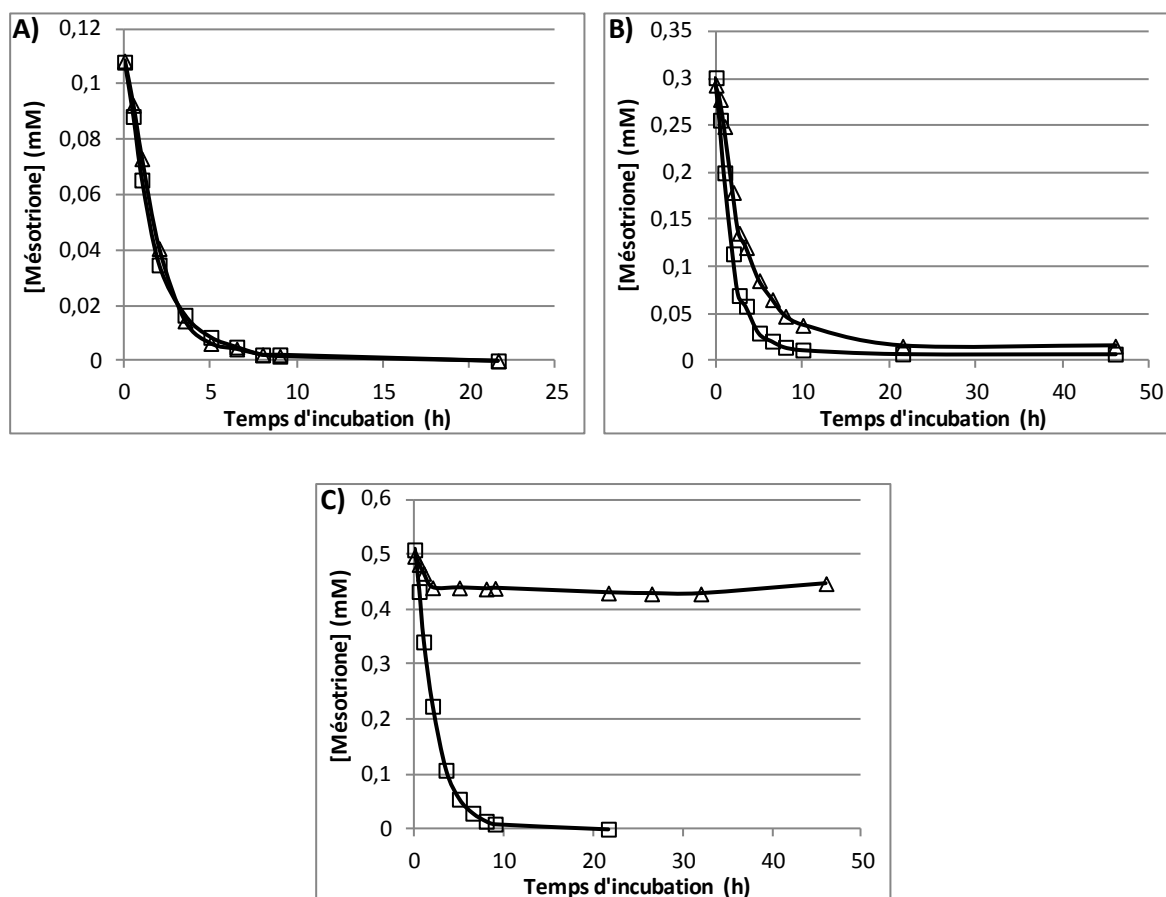


Figure 77 : Influence de la concentration de la formulation (Callisto®) (A : 0,1 ; B : 0,25 et C : 0,5 mM) sur la biodégradation de la matière active (mésotrione) par la souche *Bacillus* sp. IB11. (□) Mésotrione pure, (△) Mésotrione formulée

IV.2.3 Comparaison des deux souches *Bacillus* sp. 3B6 et *Bacillus* sp. IB11

Les souches *Bacillus* sp. 3B6 et *Bacillus* sp. IB11 ne dissipent que partiellement la mésotrione formulée (Callisto®) 0,5 mM (60 et 20 %, respectivement). Les cinétiques sont un peu différentes : pour IB11, la biodégradation a lieu pendant les 5 premières heures d'incubation et après, nous observons une inhibition complète. Par contre, la souche *Bacillus* sp. 3B6 présente un premier plateau entre 8 et 22h de dégradation lente, puis une phase de dégradation rapide entre 22 et 30h suivie par un nouveau plateau où plus aucune biodégradation n'est observée (Figure 78).

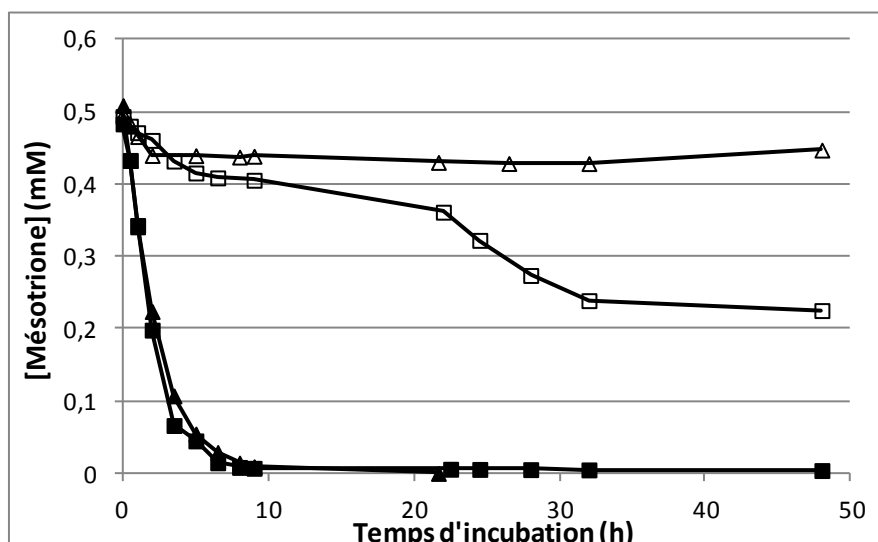


Figure 78 : Comparaison de l'effet de la formulation Callisto® (0,5 mM) sur le métabolisme des deux souches (□) *Bacillus sp. 3B6* et (△) *Bacillus sp. IB11*. (Plein) Mésotrione pure, (vide) mésotrione formulée

La Figure 78 montre que l'effet inhibiteur de la formulation est plus grand sur la souche *Bacillus sp. IB11*. La très grande différence de biodégradation entre la mésotrione 500 μM pure et celle formulée par la souche *Bacillus sp. IB11* confirme que la toxicité des adjuvants de la mésotrione sur ces cellules bactériennes est la cause de l'effet inhibiteur. Aucune étude sur l'adjuvant connu du Callisto® n'a été publiée à notre connaissance. Cependant, Clair *et al.* [2012] ont montré que les adjuvants éthoxylés sont responsables de la toxicité de formulations à base du glyphosate sur les cellules humaines.

Les métabolites apparus au cours de la dégradation de la mésotrione formulée par la souche *Bacillus sp. IB11* sont les mêmes (**M2**, **M3**, **AMBA** et **Mi**). Leurs concentrations dépendent du taux de dégradation de l'herbicide. Par exemple, pour la mésotrione 0,5 mM, les concentrations des métabolites sont faibles (10 à 20 % en comparaison avec la matière active pure) à cause de la très lente cinétique de biodégradation. **M3** est le métabolite le plus affecté, sa concentration diminue de 95 % (effet de pH). Le schéma métabolique n'est donc pas modifié par la présence des adjuvants.

IV.3. Etude comparative de la biodégradation de la mésotrione pure et formulée par deux souches Gram négatif

IV.3.1 Biodégradation de la mésotrione pure et formulée par *Escherichia coli* ATCC 11303

Cette souche dégrade partiellement la mésotrione pure. Dans cette partie, la dégradation de la mésotrione formulée à différentes concentrations est testée en comparant avec les mêmes concentrations en matière active pure. Les résultats sont présentés sur la Figure 79.

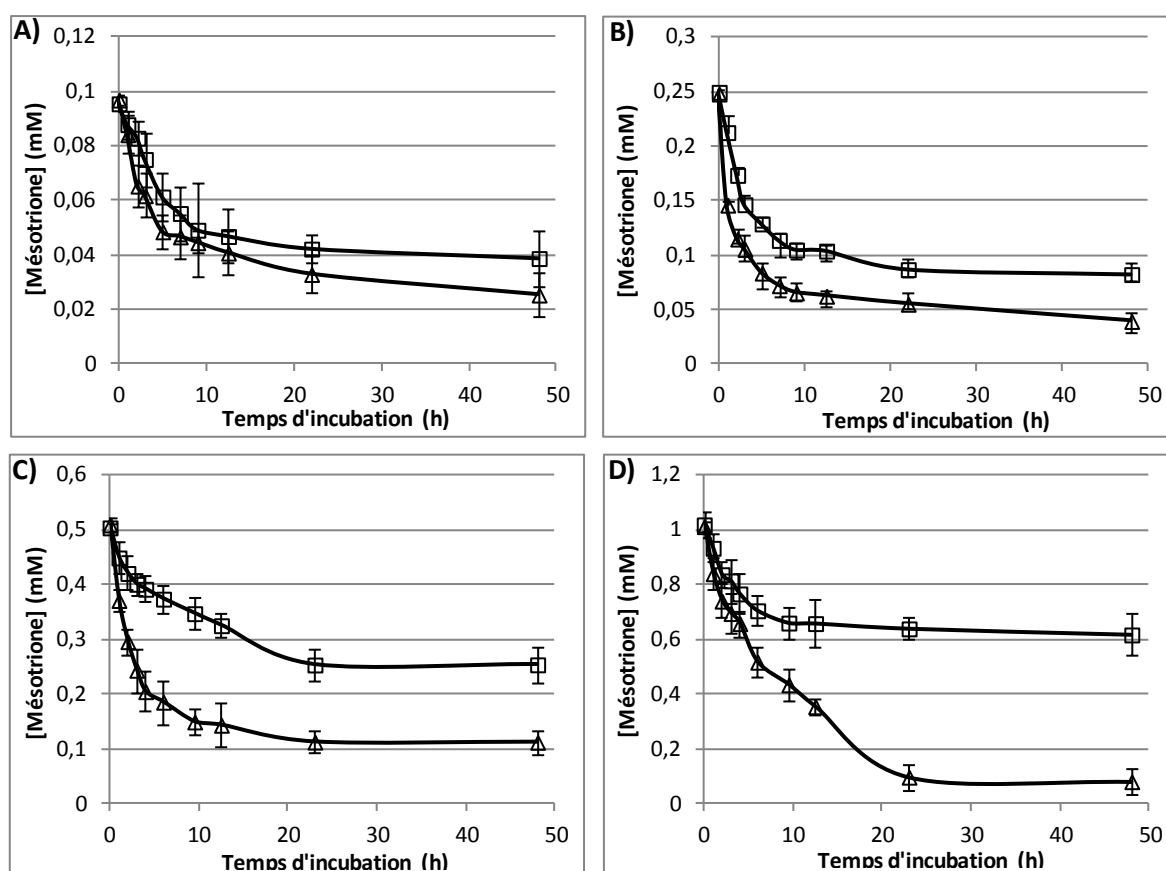


Figure 79 : Influence de la concentration de la formulation (Callisto®) (A : 0,1 ; B : 0,25 ; C : 0,5 et D : 1 mM) sur la biodégradation de la matière active (mésotrione) par la souche *E. coli* ATCC 11303. (□) Mésotrione pure, (△) Mésotrione formulée (2 cultures indépendantes)

La surprise vient du fait que quelle que soit la concentration en mésotrione, non seulement cette souche dégrade la mésotrione formulée mais le taux de dégradation est nettement supérieur à celui obtenu en présence de mésotrione pure, et ceci est d'autant plus marqué que la concentration est forte. La comparaison des pourcentages de biodégradation de

la matière active pure et formulée, au bout de 48h d'incubation, est présentée dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Pourcentage de biodégradation par la souche *E. coli* ATCC 11303 de la mésotrione seule ou formulée à différentes concentrations

Concentration	Mésotrione pure	Mésotrione formulée
0,1 mM	59,5 %	73,9%
0,25 mM	67%	84,2%
0,5 mM	60%	78,8%
1 mM	39,5%	92,1 %

Le pourcentage de biodégradation de la mésotrione formulée est élevé, dépassant toujours les 70 %. Il l'est d'autant plus que la concentration en mésotrione (et donc en adjuvants) est élevée. La matière active pure, elle, comme décrit précédemment, est moins biotransformée avec l'augmentation de la concentration, et toujours moins que la formulation.

Les résultats obtenus avec cette souche Gram négatif sont complètement différents de ceux obtenus avec les deux souches de *Bacillus*. Les adjuvants, inhibiteurs du métabolisme biodégradatif chez *Bacillus* sp. 3B6 et IB11, accélèrent et activent ce métabolisme chez la souche *E. coli* ATCC 11303.

Nous avons donc suivi, par RMN ^1H , la biodégradation des adjuvants du Callisto® 1 mM afin de chercher une explication à cet effet stimulant (Figure 80) au cours de la biodégradation de la mésotrione. Il faut noter que l'aire du massif résonnant à 3,5-4,0 ppm ($\text{CH}_2\text{-O-}$) n'a pas évolué au cours de suivi entre t_0 et 80h, ce qui montre la difficulté de la dégradation de ce groupement par les cellules bactériennes.

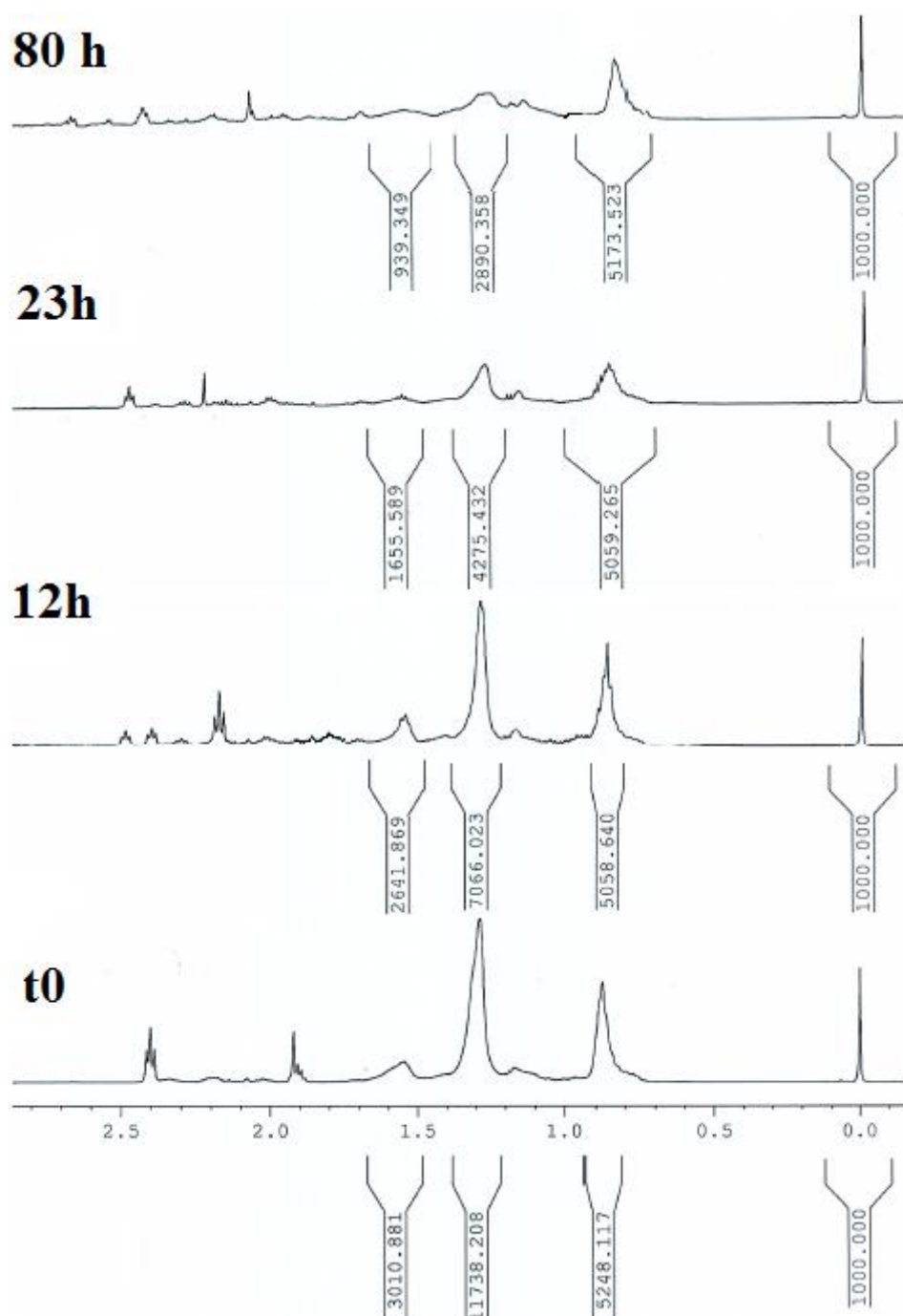


Figure 80 : Suivi par RMN ^1H de la biodégradation des adjuvants du Callisto® 1 mM par la souche *E. coli* ATCC 11303

Les spectres RMN ^1H montrent la diminution très importante du massif à 1,25-1,4 ppm, correspondant aux groupements $-\text{CH}_2-$. Les autres pics correspondant aux groupements $-\text{CH}_3$ terminaux et aux $-\text{CH}_2-\text{O}$ ont une aire qui ne varie pas de manière significative au cours du temps. Il semble que la souche dégrade la chaîne carbonée suivant les voies classiques d' ω -ou ($\omega-1$) oxydation rencontrées avec les alcanes à longues chaînes ($-\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2\text{OH} \rightarrow$

CHO → COOH → décarboxylation) *via* des étapes d'oxydation successives mono terminale [Kester et Foster, 1963 ; Nhi-Cong *et al.*, 2010]. L'alcane hydroxylase, qui est l'enzyme impliquée dans la première étape de la réaction, a été mise en évidence chez des souches bactériennes Gram négatif et positif [Smits *et al.*, 1999].

La cinétique de dégradation des groupements CH₂ de l'adjuvant (massif à 1,25-1,4 ppm) est tracée en fonction du temps d'incubation (Figure 81)

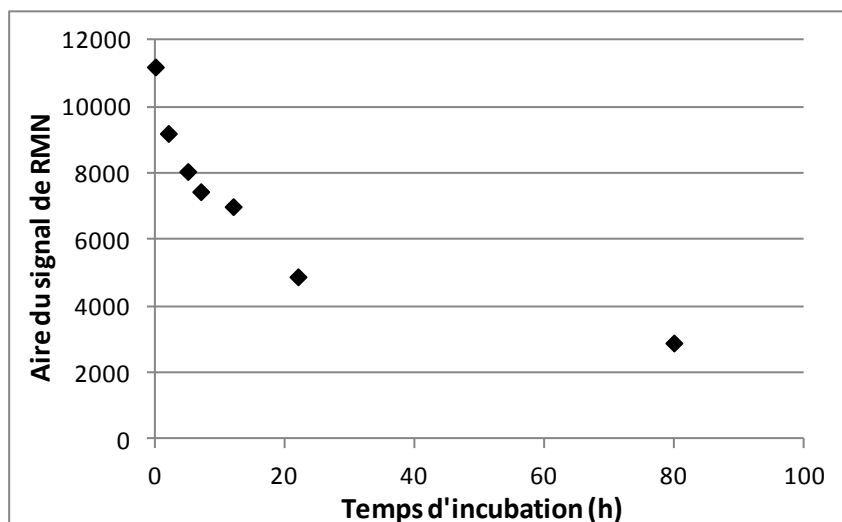


Figure 81 : Evolution de l'aire du massif à 1,25-1,4 ppm lors de la biodégradation de la mésotrione 1 mM formulée par la souche *E. coli* ATCC 11303

La Figure 81 montre une dégradation d'environ 80% d'un des adjuvants contenu dans la formulation Callisto® en parallèle avec la dégradation de la matière active, ce qui peut expliquer l'amélioration de la biodégradation de la mésotrione formulée par rapport à la matière active seule (co-métabolisme). Des dosages d'ATP pourraient permettre de mettre en évidence cet apport d'énergie.

D'autre part, le schéma métabolique de la biodégradation de la mésotrione formulée par la souche *E. coli*. ATCC 11303 est étudié, tout en le comparant avec la matière active seule. Le suivi par RMN ¹H réalisé durant l'incubation montre la présence des métabolites déjà trouvés avec la mésotrione seule (Figure 82). Les métabolites, **AMBA**, **M2**, **M3** et le métabolite inconnu sont présents, ce qui prouve que le schéma métabolique de la mésotrione ne dépend pas de la formulation. Par contre, les concentrations des métabolites sont plus importantes (environ le double) du fait que le taux de biodégradation est plus grand, sauf

pour le métabolite inconnu (**Mi**) dont la concentration maximale est du même ordre de grandeur (0,1 mM).

Par conséquent, malgré le changement de la cinétique de biodégradation de la mésotrione formulée entre les souches de *Bacillus* sp. (Gram positif) et la souche d'*E. coli* (Gram négatif), le schéma métabolique reste le même, ce qui prouve que les métabolites trouvés dans nos conditions du laboratoire peuvent potentiellement exister dans les compartiments de l'environnement après épandage du pesticide Callisto®.

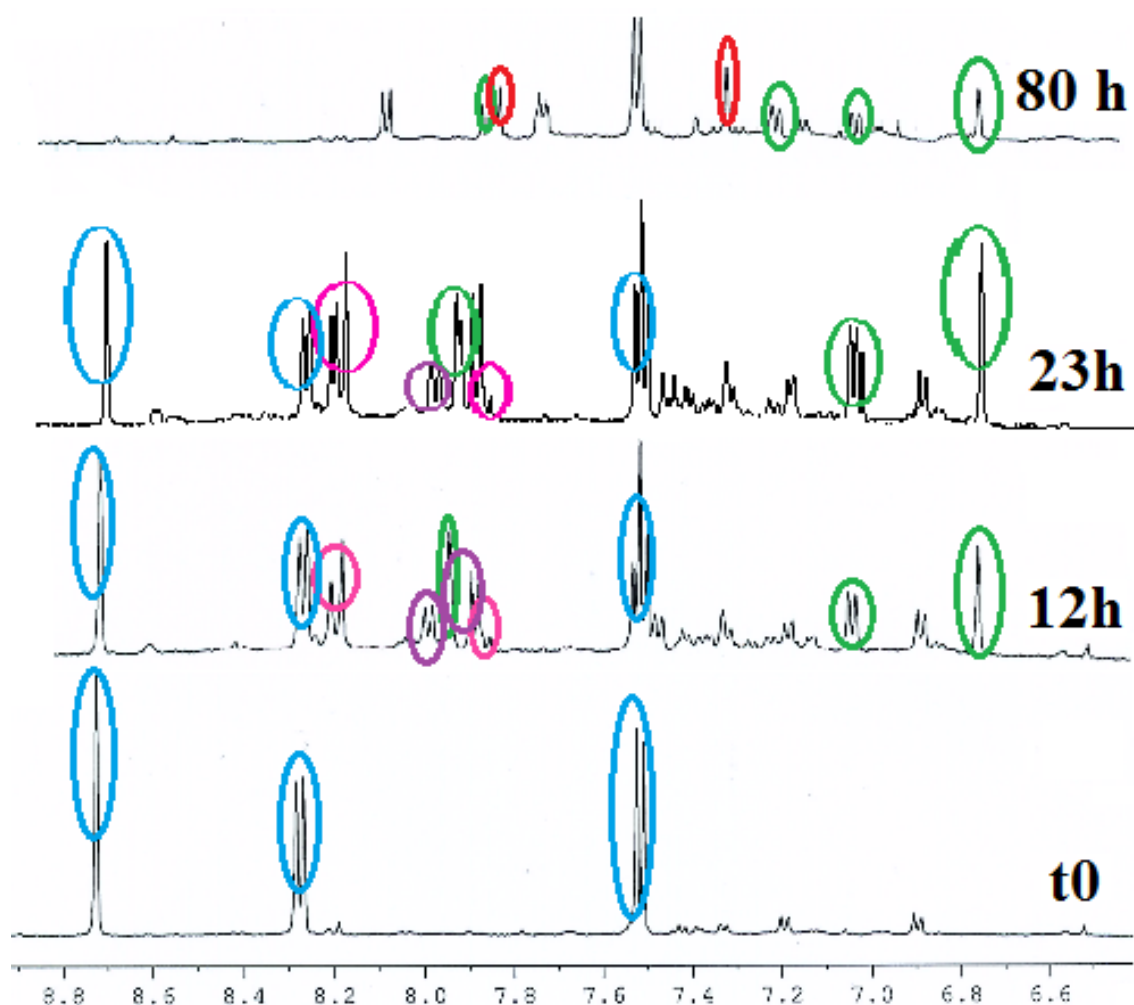


Figure 82 : Suivi par RMN ^1H de la dégradation du Callisto® 1 mM par la souche *E. coli* ATCC 11303
Mésotrione (bleu), AMBA (rouge), M2 (vert), M3 (mauve) et Mi (rose)

IV.3.2 Biodégradation de la mésotrione pure et formulée par *Pantoea* sp. 5B12

La souche *Pantoea* sp. 5B12 est la deuxième souche Gram négatif testée. Deux concentrations (0,5 et 1 mM) de la mésotrione seule ou formulée sont mises en incubation à 27°C et 200 rpm avec les cellules bactériennes (Figure 83).

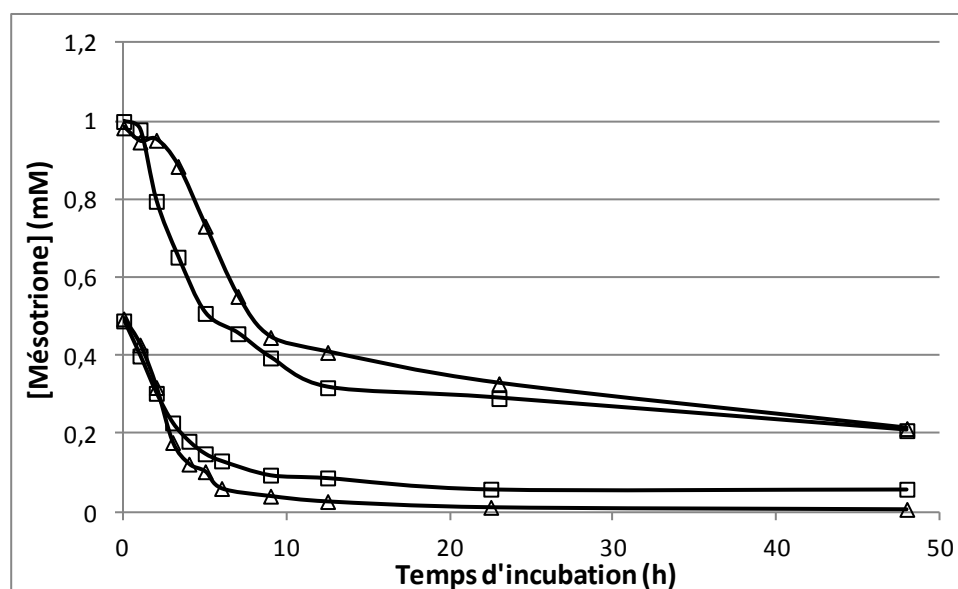


Figure 83 : Influence de la concentration de la formulation (0,5 et 1 mM) sur la biodégradation de la matière active (mésotrione) par la souche *Pantoea* sp. 5B12. (□) Mésotrione pure, (△) Mésotrione formulée

L'effet de la formulation est beaucoup moins net que dans le cas d'*E. coli* (Figure 83). Pour une concentration de 0,5 mM, la mésotrione formulée est mieux dégradée tandis que pour une concentration de 1 mM la matière active seule est légèrement mieux dégradée. Par contre, les taux de biodégradation en fin d'incubation sont presque similaires. Donc, pour cette souche, les adjuvants n'ont pas d'effet ni d'inhibition, ni d'activation sur le métabolisme biodégradatif. L'évolution des aires des signaux correspondant aux adjuvants est étudiée aussi pour cette souche par RMN ^1H , afin de mieux comprendre l'absence de toxicité du Callisto®. La Figure 84 montre une diminution progressive de l'aire du massif résonnant à 1,25-1,4 ppm entre t0 et 100h d'incubation. Par contre, celle du massif centré sur 0,8 ppm n'évolue pas pendant les 50 premières heures d'incubation, puis diminue de moitié entre 50 et 100h d'incubation.

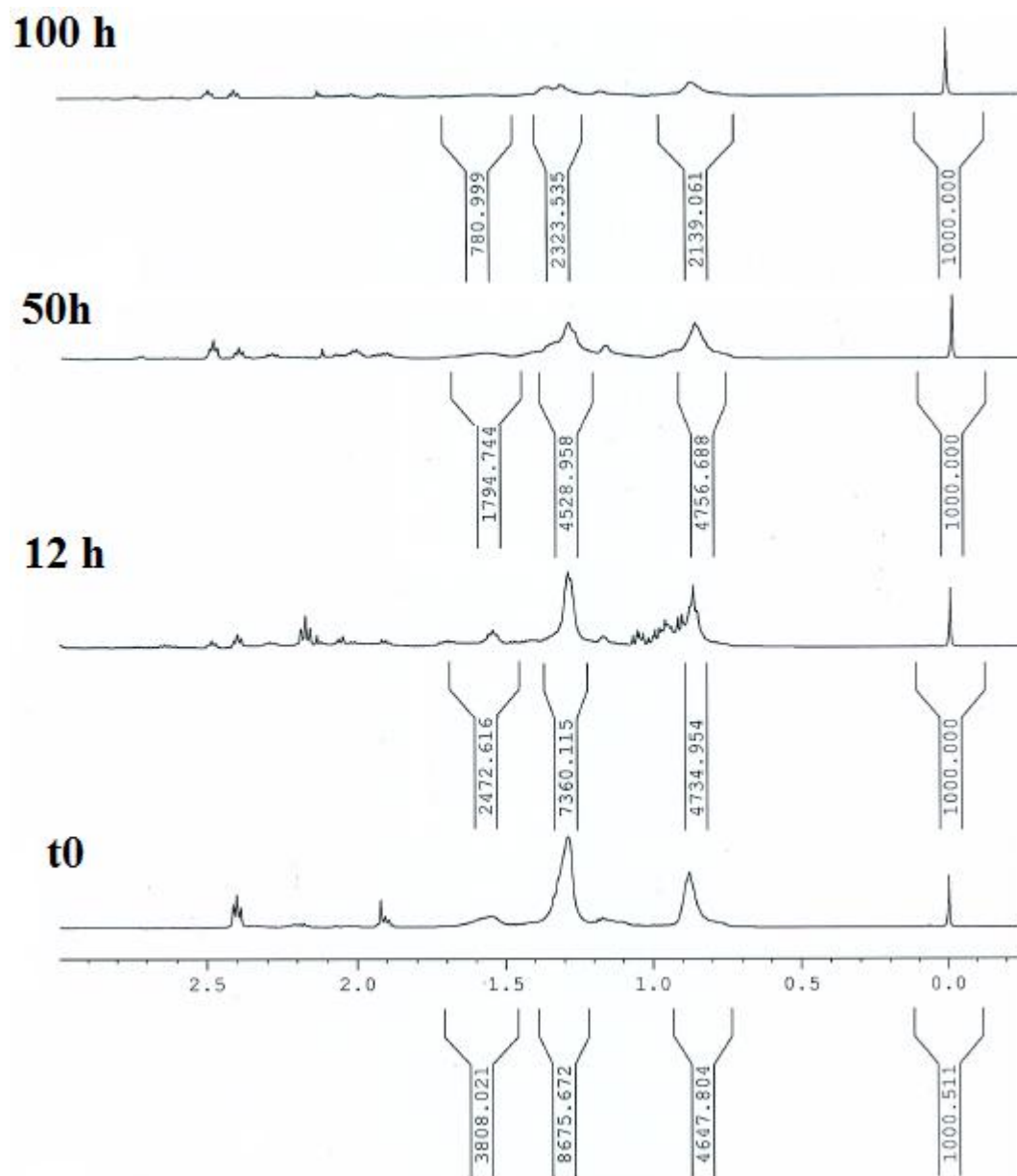


Figure 84 : Suivi par RMN ^1H de la biodégradation des adjuvants du Callisto® 1 mM par la souche *Pantoae* sp. 5B12

La cinétique de dégradation de l'adjuvant est tracée en fonction du temps d'incubation (Figure 85). Elle est plus lente que pour *E. coli*, ce qui peut peut-être expliquer l'absence d'effet stimulant marqué sur la biodégradation de la mésotrione. La dégradation des adjuvants empêche l'effet toxique des adjuvants d'opérer et explique la résistance de cette souche vis-à-vis de la formulation Callisto®, sans cependant induire de co-métabolisme (du moins aussi rapidement que pour *E. coli*).

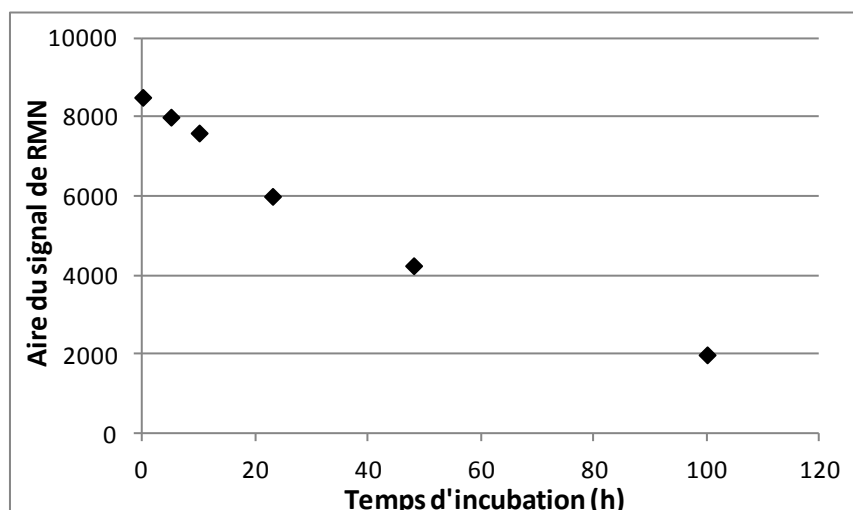


Figure 85 : Dégradation de l'adjuvant correspondant au massif à 1,25-1,4 ppm par la souche *Pantoae* sp. 5B12

Enfin, de nouveau, les mêmes métabolites sont retrouvés, l'AMBA, M1, M2 et Mi durant la dégradation du Callisto® 1 mM (Figure 86). La concentration de tous les métabolites est similaire à celle obtenue avec la mésotrione pure (0,15 mM pour Mi).

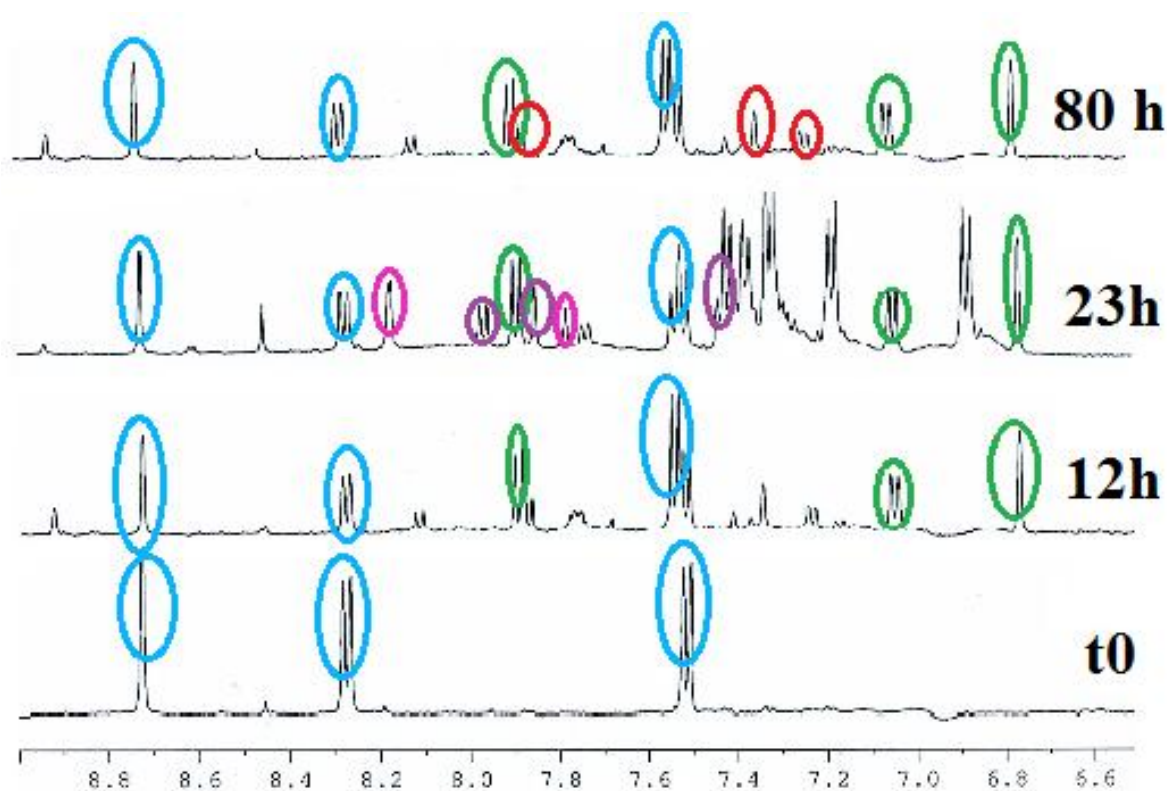


Figure 86 : Suivi par RMN ^1H de la cinétique de biodégradation de la mésotrione 1 mM par la souche *Pantoae* sp. 5B12. Mésotrione (bleu), AMBA (rouge), M2 (vert), M3 (mauve) et Mi (rose)

IV.4. Conclusion

La dégradation de la mésotrione formulée est modulée en présence des adjuvants. Cette modification est dépendante des souches bactériennes testées et de la concentration. La dégradation est fortement inhibée pour les souches de *Bacillus* sp. (Gram positif) à partir d'une concentration de 0,5 mM tandis que pour les concentrations inférieures, l'effet des adjuvants n'est pas significatif. Pour les deux souches Gram négatif testées, l'effet des adjuvants sur la biodégradation de la matière active est soit : (i) peu significatif pour *Pantoea* sp. 5B12 ; (ii) stimulant de manière croissante suivant la concentration pour *E. coli* ; ces deux souches dégradant aussi certains adjuvants.

Enfin, il faut noter que tous les métabolites, déjà identifiés avec la mésotrione pure, sont détectés lors de la dégradation du Callisto®. Par conséquent, le schéma métabolique n'est pas modifié.

V. Conclusion

Suite aux travaux de S. Durand et d'I. Batisson, nous avons pu comparer les capacités et efficacités de biodégradation de la mésotrione pour 9 souches bactériennes, Gram positif et négatif, avec celles de la souche *Bacillus* sp. 3B6 prise comme référence. Si les cinétiques et les taux de biodégradation de cet herbicide sont variables d'une souche à l'autre pour une biomasse similaire, les voies métaboliques identifiées peuvent s'inscrire dans un schéma général global, la réaction initiale étant la réduction du groupement $-NO_2$ en hydroxylamine (Métabolite **M2**). Un nouveau métabolite, **Mi**, a pu être mis en évidence pour deux souches de *Bacillus* sp. et les deux souches Gram négatif testées. Ce métabolite n'a pas pu être identifié avec certitude mais il s'inscrit très vraisemblablement comme une variante de la biodégradation du premier métabolite **M2**.

Les essais avec la matière active formulée ont montré une forte inhibition de la biodégradation avec les souches Gram positif, croissante avec sa concentration, et une stimulation plus ou moins significative avec les souches Gram négatif. Aucune modification du schéma métabolique de dégradation n'a été observée, des variations de concentrations des métabolites liées logiquement aux modulations des taux de transformation de la matière active étant les seules différences.

Etude de la biodégradation du tébuconazole, pur et formulé

I. Recherche de microorganismes capables de dégrader le tébuconazole pur

La première étape de cette étude a été de réaliser un large criblage de microorganismes, isolés de différents compartiments environnementaux mais également provenant de banques de souches commerciales, afin de sélectionner ceux aptes à biotransformer le tébuconazole. Nous avons évalué les capacités de biodégradation en réalisant des tests avec des cellules au repos métabolique (à raison de 5 g de biomasse humide dans 100 mL d'une solution 0,1 mM de tébuconazole). La température d'incubation est 27°C. La dissipation du tébuconazole est suivie régulièrement par HPLC sur 5 jours d'incubation. Un témoin correspondant à une solution de tébuconazole sans cellules a été incubé dans les mêmes conditions. Aucune disparition du fongicide n'a été observée dans ce témoin abiotique.

Les souches testées sont :

- soit celles qui dégradent la mésotrione. Nous avons voulu savoir si ces souches étaient également capables de dégrader un pesticide ayant une structure chimique complètement différente ;
- soit des souches de collection commerciales ;
- soit des souches issues de la souchothèque du laboratoire, qui ont été précédemment isolées de sols contaminés ou d'eau de nuages prélevée au sommet du Puy de Dôme.

Le Tableau 23 présente les taux de disparition du tébuconazole obtenus après 5 jours d'incubation pour les bactéries, les champignons et les levures testées.

Tableau 23 : Tests de dissipation du tébuconazole. Taux de disparition après 5 jours d'incubation. Essais avec des cellules au repos métabolique –Tébuconazole 0,1 mM

SOUCHES	Taux de disparition	SOUCHES	Taux de disparition
Bactéries Gram positif		Bactéries Gram négatif	
<i>Arthrobacter</i> sp. 7B9	0	<i>Burkholderia</i> sp. 1B1	0
<i>Arthrobacter</i> sp. N4	0	<i>Chelatobacter heinzii</i> SR45	0
<i>Arthrobacter</i> sp. SR30	0	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	0
<i>Bacillus cereus</i> 2B9	30%	<i>Janthinobacterium</i> sp. 2B18	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0	<i>Pantoea</i> sp. 12B5	0
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145	0
<i>Bacillus pumilus</i> 5B1	0	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69B	0
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	50%	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 21244	60%
<i>Bacillus</i> sp. 29B3	50%	<i>Pseudomonas putida</i> DSM 84	50%
<i>Bacillus</i> sp. IB1	0	<i>Pseudomonas</i> sp. 14B10	0
		<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	0
<i>Bacillus</i> sp. IB4	0	<i>Pseudomonas</i> sp. C12B ATCC 43648	40%
<i>Bacillus</i> sp. IB8	0	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> IB78	0
<i>Bacillus</i> sp. IB10	0	<i>Pseudomonas syringae</i> 12B8	0
<i>Bacillus</i> sp. IB11	0	<i>Sphingomonas</i> sp. 7B15	0
<i>Bacillus</i> sp. IB13	30%	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IB93	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0	Champignons	
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> 2B3	0		
<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i> RP1	0	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	0
<i>Nocardia asteroides</i> LAB 911	35%	<i>Geotrichum candidum</i> CBS 14488	0
<i>Nocardia rubra</i> ATCC 15906	0	Levures	
<i>Rhodococcus erythropolis</i> BTS1	0	<i>Aureobasidium pullulans</i> G	0
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> OBT18	0	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 2046	16%
<i>Rhodococcus</i> sp. PA	0	<i>Cryptococcus</i> sp. 28B7	0
<i>Streptomyces</i> sp. 1S1	0	<i>Cryptococcus victoriae</i> 28B3	0
<i>Streptomyces</i> sp. 5S4	0	<i>Diozegia crocea</i> 28B1	0
<i>Streptomyces</i> sp. 5S10b	0		

Au total, 50 souches, essentiellement bactériennes, ont été testées et aucune n'est capable de dégrader complètement le tébuconazole. Neuf souches ont permis la disparition de 16 à 60% du tébuconazole après 5 jours d'incubation : 8 souches bactériennes (5 souches Gram positif dont 4 *Bacillus* et 3 souches Gram négatif, toutes du genre *Pseudomonas*) et une souche de levure : *Candida parapsilosis* ATCC 2046.

Pour la suite de nos études, nous avons sélectionné les 3 souches bactériennes les plus efficaces : la souche *Bacillus* sp. 3B6 (isolée de l'eau des nuages), qui dégrade également la mésotrione [Durand *et al.*, 2006a], et les deux souches commerciales, *Pseudomonas putida* ATCC 21244 et *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648, qui sont capables de dissiper 40 et 60% de tébuconazole, respectivement.

II. Etude de la biodégradation du tébuconazole pur par la souche *Bacillus* sp. 3B6

II.1. Cinétiques de dissipation du tébuconazole pur

Après 24h de culture sur milieu Trypcase-Soja (TS), la souche *Bacillus* sp. 3B6 (cellules au repos métabolique correspondant à 200 mL de culture) est incubée en présence de tébuconazole (100 mL) à différentes concentrations : 1, 5, 10, 50 et 100 μM . Nous sommes limités par la faible solubilité du tébuconazole dans l'eau (36 mg.L^{-1} à 25°C et pH = 7 correspondant à $\sim 100 \mu\text{M}$). La température d'incubation est de 27°C. Des prélèvements réguliers de 1 mL sont effectués sur 3 jours d'incubation pour le suivi cinétique par HPLC. Un témoin correspondant à une suspension bactérienne en absence de tébuconazole est réalisé dans les mêmes conditions d'incubation afin de différencier les métabolites propres aux cellules de ceux issus de la biodégradation du fongicide. Chaque essai a été répété au minimum trois fois.

Au cours de la thèse, nous avons travaillé avec deux lots congelés de la souche *Bacillus* sp. 3B6 différents. **Ces deux lots ont donné des résultats différents en termes de taux de biotransformation du tébuconazole**, même si les cinétiques et surtout les métabolites formés étaient identiques. Toutes les expériences n'ont pas été répétées avec les deux lots. Nous présenterons donc les résultats obtenus au cours de cette thèse en précisant à chaque fois le lot (**1** ou **2**) utilisé.

Les cinétiques de disparition du tébuconazole   différentes concentrations par le **lot 1** de *Bacillus* sp. 3B6 sont présentées sur la Figure 87. Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque concentration, en partant de 200 mL de culture pour un volume final de 40 mL de solution de tébuconazole.

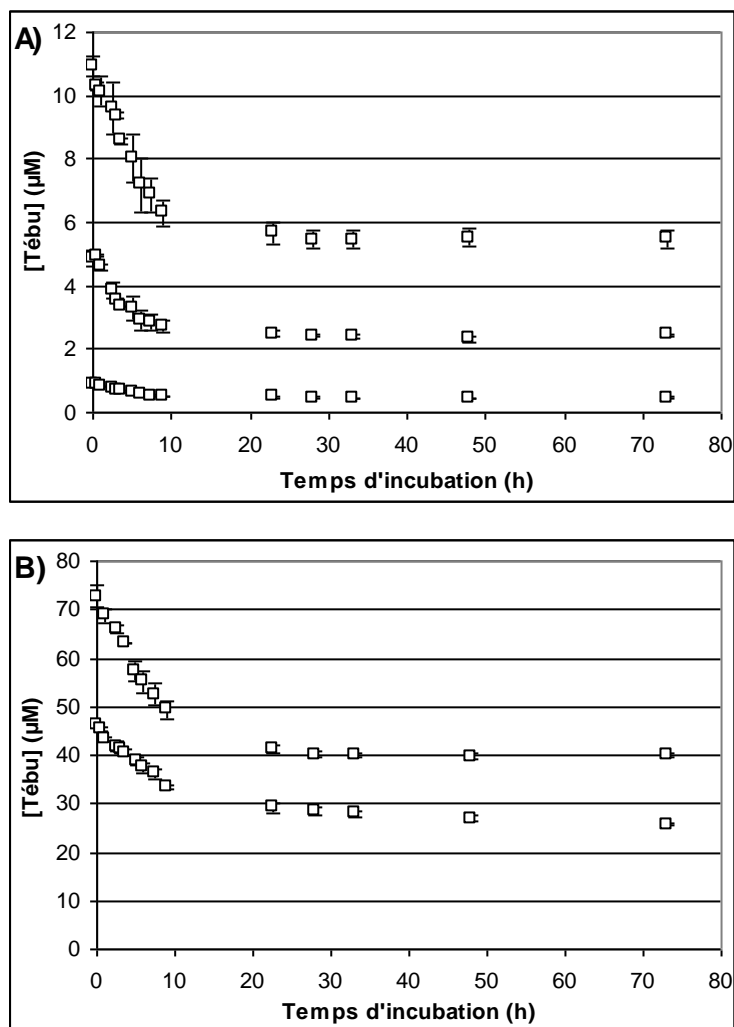


Figure 87 : Cinétiques de dissipation du tébuconazole par la souche *Bacillus* sp. 3B6 (lot 1)   (A) 1, 5 et 10 μM et (B) 50 et 100 μM (3 cultures indépendantes)

Nous pouvons observer que la concentration de tébuconazole diminue quelle que soit la concentration initiale et ce, de manière très reproductible. Celle-ci est très proche de la concentration théorique attendue sauf dans le cas de l'essai à 100 μM . Ceci peut s'expliquer par le fait que la souche *Bacillus* sp. 3B6 culotte très mal et qu'une dilution ne peut être évitée lorsque nous utilisons la solution de tébuconazole à la concentration maximale. Après calcul de ce facteur de dilution, la concentration théorique attendue est de 80 μM .

Nous pouvons également remarquer que la cinétique de dissipation obtenue se décompose en deux étapes : une phase de disparition rapide du tébuconazole pendant les

premières 24 heures, puis un plateau pendant les 48 heures suivantes où une très faible dissipation est observée (entre 0 et 10% supplémentaires au maximum). Une autre remarque importante est que pour tous ces essais, le taux de biotransformation est d'environ 50% et ce, quelle que soit la concentration initiale.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises sur le fait que plus aucune évolution n'est observée après 24h d'incubation : soit les bactéries ont épuisé toutes leurs réserves et ne sont donc plus capables de poursuivre la transformation du tébuconazole, soit un des métabolites formés est toxique pour les cellules.

Nous avons donc voulu savoir si en travaillant dans un milieu minimum possédant une source d'azote (NH_4Cl), plutôt que dans l'eau de Volvic®, la souche pouvait dissiper un pourcentage plus important de tébuconazole. Nous avons uniquement travaillé avec des concentrations en tébuconazole de 1 à 50 μM .

Aucune différence significative sur la cinétique et le taux de biotransformation du tébuconazole n'est observée entre eau et milieu minimum, quelle que soit la concentration initiale. Deux exemples de cinétiques de dissipation comparées du tébuconazole (1 et 10 μM) sont présentés sur la Figure 88.

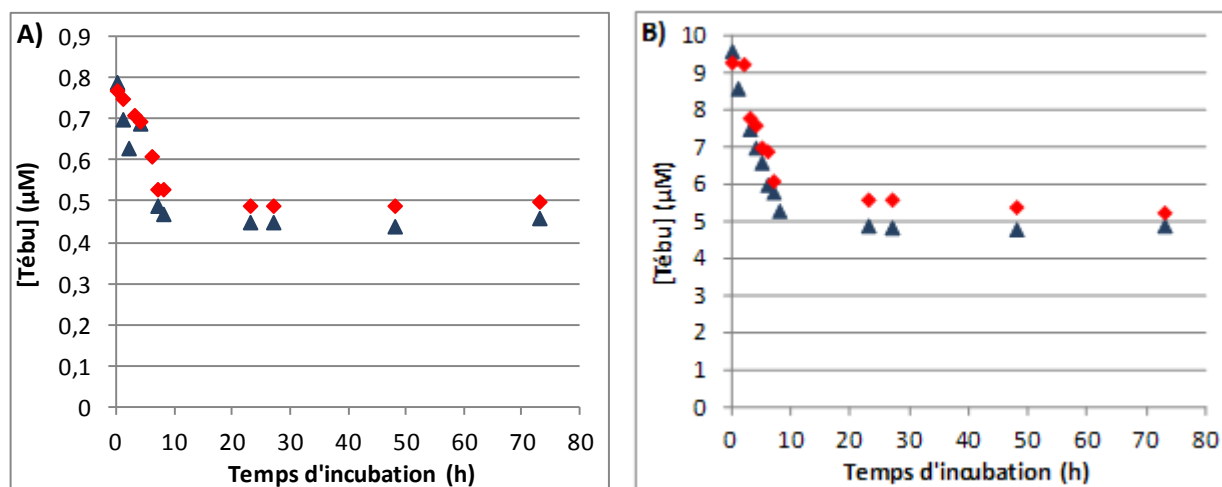


Figure 88 : Cinétiques de dissipation du tébuconazole par la souche *Bacillus* sp. 3B6 (lot 1) dans l'eau de Volvic (▲) ou dans un milieu minéral contenant une source d'azote (◆) pour une concentration initiale de (A) 1 μM et (B) 10 μM

Le tébuconazole n'est peut être pas source d'énergie ou la source d'azote choisie n'est peut être pas assimilée par *Bacillus* sp. 3B6. Par contre, ce taux de biotransformation du tébuconazole de 50 %, quelles que soient les conditions, nous a fait penser à une dégradation énantiosélective du tébuconazole, comme reporté dans la littérature lors de son métabolisme chez le lapin [Zhu *et al.*, 2007] ou chez la truite [Konwick *et al.*, 2006]. En effet, le

tébuconazole étant commercialisé sous forme racémique, l'un des énantiomères pourrait être biotransformé de manière exclusive ou privilégiée (Figure 89).

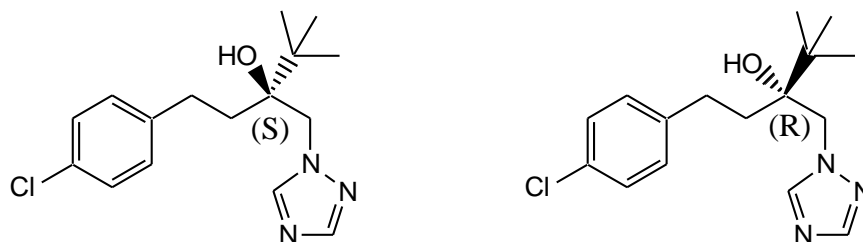


Figure 89 : Les deux énantiomères du tébuconazole

Nous avons donc suivi l'évolution de l'excès énantiomérique du tébuconazole au cours du temps lors de sa biodégradation par *Bacillus* sp. 3B6.

II.2. Suivi de l'énantiosélectivité de la biotransformation du tébuconazole

L'étude bibliographique sur les méthodes de séparation des énantiomères du tébuconazole par HPLC chirale est relativement restreinte [Hou *et al.*, 2003 ; Zhu *et al.*, 2007 ; Zhou *et al.*, 2009] mais pour la mise au point de notre méthode d'analyse, nous nous sommes appuyés sur la publication de Zhou *et al.* [2009]. Ces auteurs utilisent une colonne CHIRALCEL OD [Cellulose tris-(3,5-diméthylphényl-carbamate)] avec un éluant hexane/propan-2-ol (phase normale) et obtiennent de bonnes séparations des énantiomères du tébuconazole.

Des premières mises au point ont donc été réalisées à partir de solutions aqueuses pures plus ou moins diluées de tébuconazole (5, 10, 25, 50, 75 et 100 μM) pour vérifier le bon taux de recouvrement du tébuconazole au cours du protocole : extraction du tébuconazole dans l'acétate d'éthyle (1 et 6 mL de solution de tébuconazole prélevée pour une extraction par 500 μL et 3 mL d'acétate d'éthyle, respectivement), évaporation de la phase organique après séchage sur MgSO_4 sous un courant d'azote et reprise du résidu dans l'éluant HPLC. Nous avons vérifié qu'une deuxième extraction n'apportait aucune amélioration, le tébuconazole étant très soluble dans l'acétate d'éthyle ($> 250 \text{ g.L}^{-1}$). Chaque expérience a été répétée trois fois. Le taux de recouvrement varie suivant les concentrations et les conditions de volume entre 99,1 et 100,7 %. Nous avons donc considéré qu'aucune perte significative de tébuconazole n'avait lieu au cours de notre protocole.

Avec ces échantillons, nous avons ensuite procédé aux essais sur HPLC chirale. La meilleure séparation des deux énantiomères du tébuconazole est obtenue en travaillant en mode isocratique avec un éluant hexane/isopropanol 90/10 et un débit de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Dans ces conditions, les deux énantiomères ont des temps de rétention de 39 et 43 min (Figure 90). En comparant à la publication de Zhou *et al.* [2009], qui trouvent des temps de rétention dans des conditions d'analyse similaires de 37 et 41 min environ, nous avons attribué le premier pic à l'énantiomère (-)-(R) et le deuxième, à l'énantiomère (+)-(S).

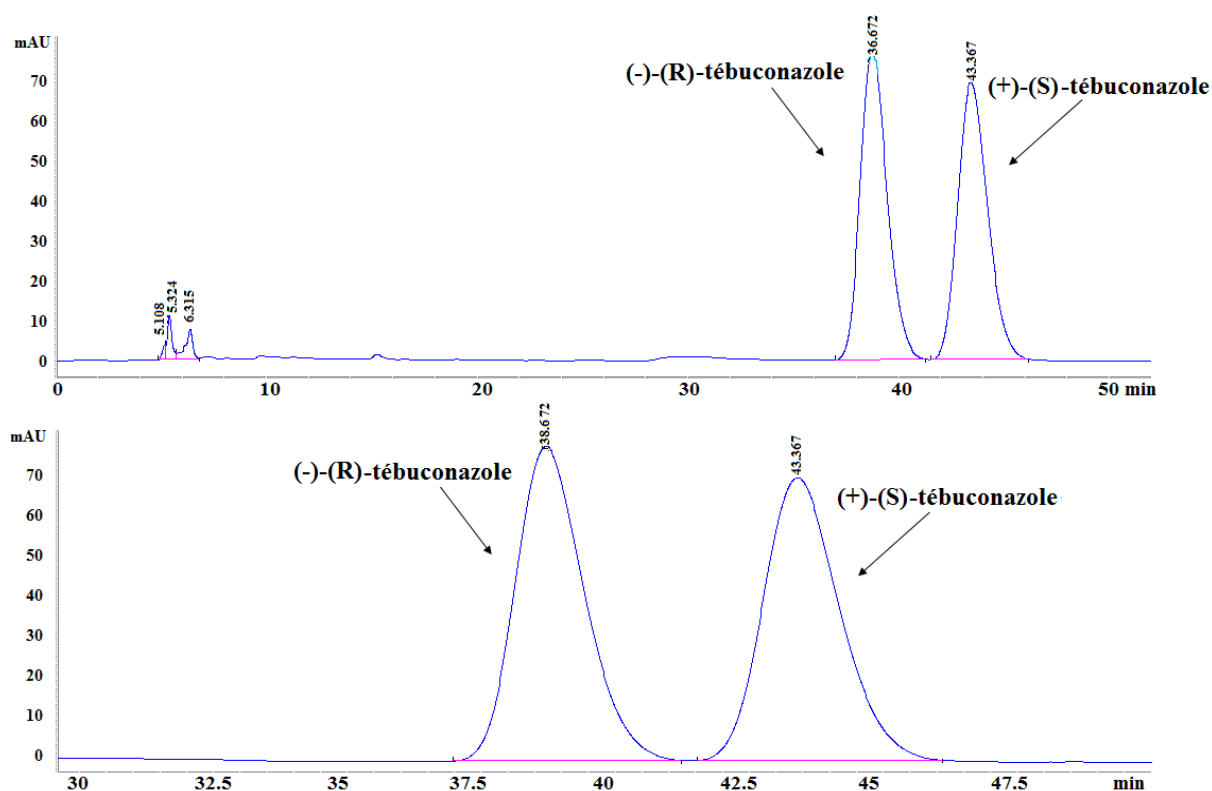


Figure 90 : Chromatogrammes HPLC sur colonne chirale (CHIRALCEL OD) du tébuconazole racémique commercial

Après mise au point du protocole, nous avons effectué des premiers essais sur quelques échantillons « réels » obtenus lors de la biodégradation du tébuconazole $50 \mu\text{M}$ par *Bacillus* sp. 3B6. Nous avons choisi les temps T0, 5h et 73h. A partir de ces surnageants (1 mL) et après avoir appliqué le protocole décrit succinctement précédemment, nous avons pu mettre en évidence une énantiosélectivité de la biodégradation, qui augmente avec le temps. Cependant, les volumes initiaux de surnageant étant faibles (1 mL) et les échantillons étant limités à un seul par temps, nous avons décidé de refaire une expérience quantitative de

biodégradation du tébuconazole, en travaillant en fermenteur pour pouvoir prélever des volumes plus importants à chaque temps (6 mL) et en duplicat. Des échantillons (1 mL) sont prélevés en parallèle pour suivre la cinétique de biodégradation du tébuconazole et vérifier qu'il n'y a pas de grosses variations entre expérience en erlenmeyer et en fermenteur.

Pour cette expérience, nous sommes partis de 4 L de culture de *Bacillus* sp. 3B6. Après centrifugation et lavages par une solution de NaCl 0,8 % et de l'eau de Volvic  , le culot bactérien (200 mL) est repris par 600 mL de tébuconazole 100   M. Des prélèvements r  guli  rs sont effectués et analysés par HPLC en phase inverse pour le suivi cinétique de la biodégradation et par HPLC chirale, après extraction, pour le suivi de l'excès énantiomérique au cours du temps.

La concentration initiale de tébuconazole mesurée est en accord avec la concentration théorique attendue de 75   M (Figure 91). La cinétique de biodégradation obtenue en fermenteur est très similaire à celle obtenue en erlenmeyer : une phase de disparition rapide du tébuconazole pendant les 24 premières heures suivie d'un plateau. Le taux de biotransformation du tébuconazole est de 47%.

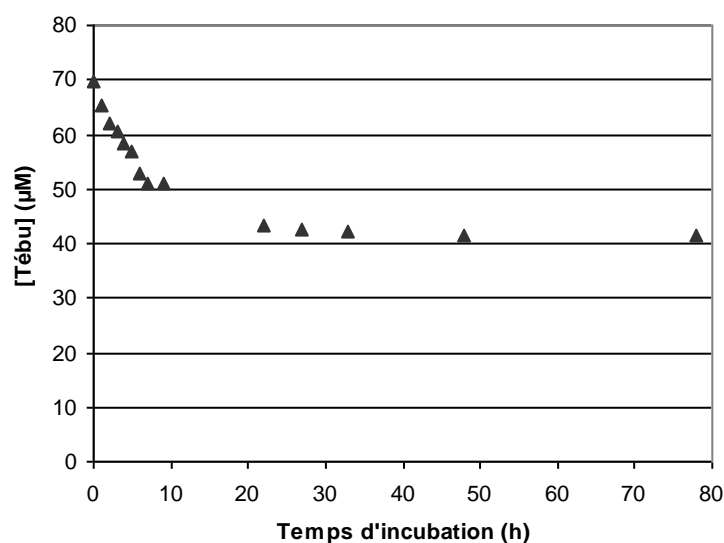


Figure 91 : Cinétique de dissipation du tébuconazole (75   M) par *Bacillus* sp. 3B6 (lot 1) lors d'un essai en fermenteur

Après extraction à l'acétate d'éthyle des surnageants de la cinétique de dissipation du tébuconazole et préparation des échantillons suivant le protocole décrit précédemment, les extraits ont été analysés par HPLC chirale. L'excès énantiomérique (ee) est défini comme :

$$ee = ([+] - [-]) / ([+] + [-]) \times 100$$

Le tébuconazole commercial est un mélange racémique contenant les deux énantiomères en même proportion. L'excès énantiomérique est donc de 0 pour la solution initiale de tébuconazole. Son évolution au cours du temps est présentée sur la Figure 92.

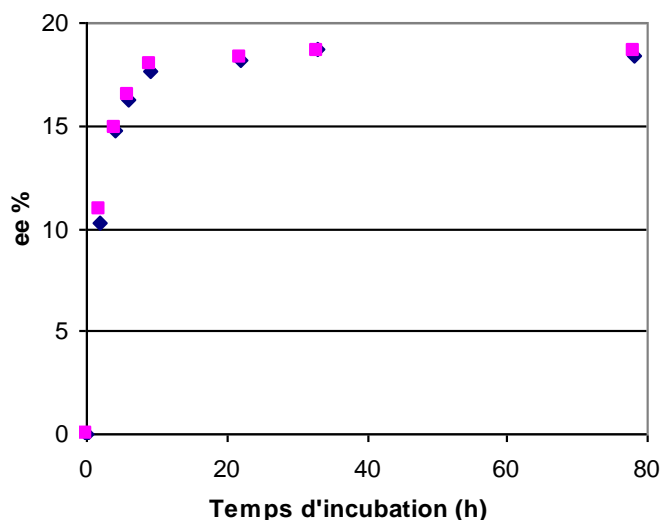


Figure 92 : Evolution de l'excès énantiomérique du tébuconazole lors de sa biodégradation par *Bacillus* sp. 3B6 (lot 1) (2 essais)

L'évolution de l'excès énantiomérique observé montre que la biodégradation du tébuconazole est énantiosélective. Le (-)-(R)-tébuconazole est toujours majoritaire dans le surnageant et semble donc moins facilement dégradé que son énantiomère. Dans l'étude de Zhu *et al.* [2007] sur le métabolisme du tébuconazole chez le lapin, les auteurs ont montré une dissipation plus rapide de l'énantiomère (+) dans le plasma et une concentration toujours plus faible de ce même énantiomère dans les muscles ou le foie. Cependant, tout comme dans cette étude, l'excès énantiomérique reste faible (18 %) et les 50 % du taux de dégradation observé lors de la biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6 ne peuvent s'expliquer par la dégradation d'un seul énantiomère.

L'apparition du plateau lors de la cinétique de biodégradation à 50 % de taux de transformation pourrait alors s'expliquer par la formation de métabolites toxiques pour les cellules. Nous avons voulu vérifier l'impact de la biomasse bactérienne sur la cinétique et le taux de biodégradation du tébuconazole.

II.3. Modifications des conditions de dissipation du tébuconazole

Lors de cette expérience, nous avons dû utiliser un nouveau lot de *Bacillus* sp. 3B6 congelé (**lot 2**), issu de la congélation d'une culture du **lot 1** donc correspondant à une génération supplémentaire.

Nous avons donc réalisé une expérience en comparant les cinétiques de dissipation du tébuconazole (50 μM) en présence d'une biomasse croissante de *Bacillus* sp. 3B6. Nous sommes partis de 200 mL (conditions classiques jusque là), puis 400 et 500 mL de culture. Les résultats sont présentés sur la Figure 93.

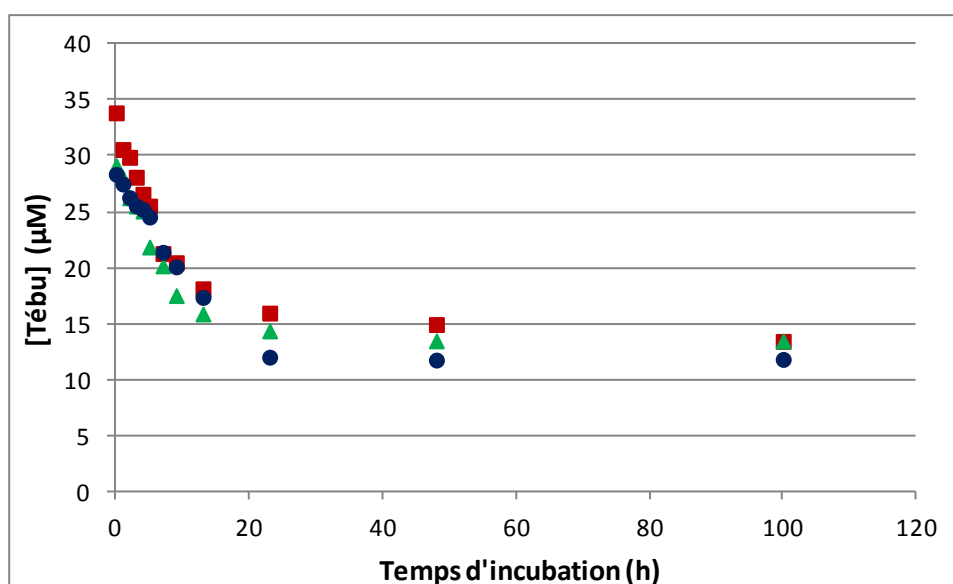


Figure 93 : Effet de la biomasse bactérienne correspondant à 200 mL (■), 400 mL (▲) et 500 mL (●) de culture sur la dissipation du tébuconazole (50 μM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6 (lot 2)

Dans les conditions classiques (200 mL de culture), nous pouvons remarquer que la concentration initiale retrouvée est faible par rapport à celle théorique attendue : 34 μM avec ce nouveau lot (**lot 2**) au lieu de 46 à 48 μM pour les expériences précédentes (**lot 1**). Plus la biomasse augmente et plus la concentration initiale diminue. D'autre part, le pourcentage de dissipation du tébuconazole est supérieur à 50% que nous considérons la concentration mesurée (60 %) ou *a fortiori* la concentration attendue (72 %). Il semble donc que ce nouveau lot de *Bacillus* sp. 3B6 ait un comportement assez différent du précédent.

La comparaison des cinétiques et du taux de dissipation du tébuconazole en présence d'une biomasse croissante (correspondant à 200, 400 et 500 mL de culture bactérienne) montre des différences assez peu significatives pour ces deux paramètres. En doublant la

biomasse bactérienne, le taux de dissipation n'est pas amélioré (Figure 93). La seule différence est la concentration initiale en tébuconazole mesurée. On peut supposer soit que le tébuconazole est très rapidement biotransformé, soit qu'il est en partie biosorbé. Il faut rappeler que cette souche culotte très mal (le nouveau lot étant encore pire que le précédent), sans doute du fait de la production d'exopolymères (EPS), qui sont connus pour contribuer aux processus de sorption des composés peu hydrophiles [Späth *et al.*, 1998 ; Wo et Love, 2011].

Pour vérifier cette deuxième hypothèse, nous avons répété l'expérience précédente, pour le tébuconazole à 50 μM , en répartissant la suspension cellulaire obtenue après centrifugation et lavages dans quatre petits erlenmeyers, qui sont traités en entier à T0, T_{7h}, T_{23h} et T_{75h} de la manière suivante : après centrifugation, le surnageant est congelé à -25°C jusqu'aux analyses. Une extraction du « culot » au méthanol est réalisée pendant une nuit sous agitation vigoureuse. Après centrifugation, les différents extraits méthanoliques sont analysés par HPLC. Les résultats des expériences réalisées avec différentes biomasses bactériennes, correspondant à 200, 400 et 500 mL de culture initiale, sont présentés sur la Figure 94.

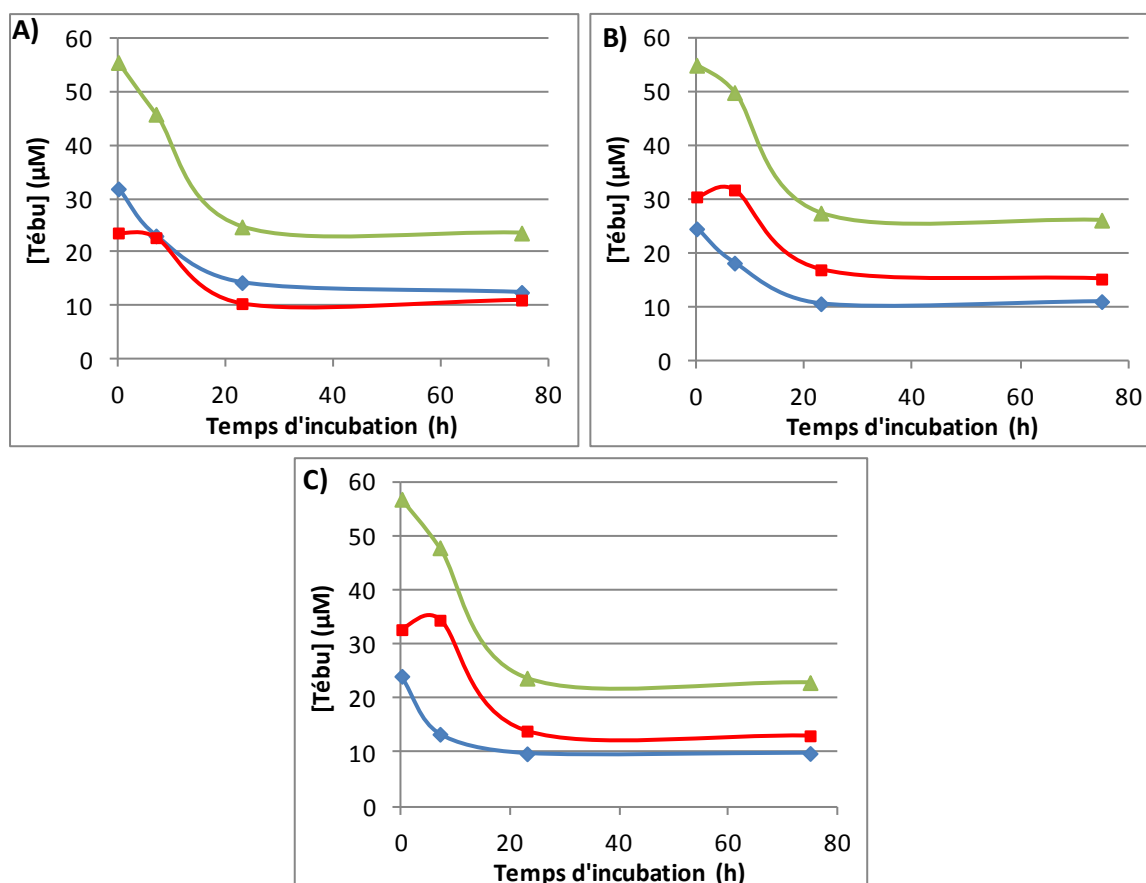


Figure 94 : Suivi du contenu en tébuconazole (50 µM) dans le surnageant (◆) et dans le culot bactérien (■) lors de sa dissipation par *Bacillus* sp. 3B6 avec différentes biomasses correspondant à (A) 200 mL, (B) 400 mL et (C) 500 mL de culture. (▲) Concentration totale en tébuconazole.

A T0, une concentration très importante de tébuconazole est retrouvée dans le culot bactérien, d'autant plus importante que la biomasse est forte, ce qui confirme notre hypothèse de sorption de ce composé sur/dans les cellules. Le tébuconazole est même retrouvé en plus forte concentration dans le culot que dans le surnageant pour les fortes biomasses. Ce processus de biosorption est extrêmement rapide puisque par exemple, 57% du tébuconazole se trouve dans le culot pour la plus forte biomasse testée (correspondant à 500 mL de culture initiale) à T0. Ce composé, plutôt hydrophobe, a donc tendance à s'adsorber sur les cellules. Ce processus de biosorption du tébuconazole a été largement décrit pour les boues activées des stations d'épuration [Kahle *et al.*, 2008 ; Stamatis *et al.*, 2010] mais pas dans le cas de microorganismes isolés. Il s'agit d'un phénomène couramment rencontré et étudié, même si tous les mécanismes ne sont pas complètement compris. Par exemple, Ju *et al.* [1997] ont étudié la biosorption du lindane (1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane) par différentes souches bactériennes dont une souche de *Bacillus subtilis* qui adsorbe en moins d'une demie-heure 25

% du pesticide (4 mg/L). Des interactions de type hydrophobes et van der Waals ont été mises en évidence. De même, Hong *et al.* [2000] ont étudié la biosorption de 1,2,3,4-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine par des cellules vivantes et mortes (stérilisées) de *Bacillus pumilus*. La biosorption est fortement augmentée sur les cellules mortes (détérioration des membranes, plus d'activité des transporteurs) mais, outre les interactions directes, ces auteurs ont mis en évidence le rôle clef de la production de polymères extracellulaires (type EPS) dans ce processus.

En sommant les concentrations retrouvées dans le surnageant et dans le culot, la concentration théorique initiale attendue de 50 μ M est retrouvée. Elle est même un peu surestimée du fait que cette souche ne culotte pas bien et que lors de l'extraction du culot au méthanol, il reste toujours un peu de surnageant. Les cinétiques de disparition du tébuconazole dans le surnageant et dans le culot sont très similaires, la concentration dans le culot étant supérieure pour les fortes biomasses pendant les 3 jours d'incubation. Il semble donc qu'il y ait un équilibre de concentration entre les cellules et le milieu externe.

Il faut quand même noter que ce processus était très minime avec le **lot 1** de *Bacillus* sp. 3B6 (entre 5 et 15 % de perte du tébuconazole dans le surnageant à T0 suivant les concentrations en partant de 200 mL de culture), le **lot 2** favorisant la production d'EPS (il culotte beaucoup moins bien).

La comparaison des cinétiques, prenant en compte les concentrations trouvées en tébuconazole dans le culot et dans le surnageant, et des taux de disparition (55-60%) montre que la dissipation par la souche *Bacillus* sp. 3B6 est complètement indépendante de la quantité de cellules bactériennes présentes dans le milieu (Figure 95).

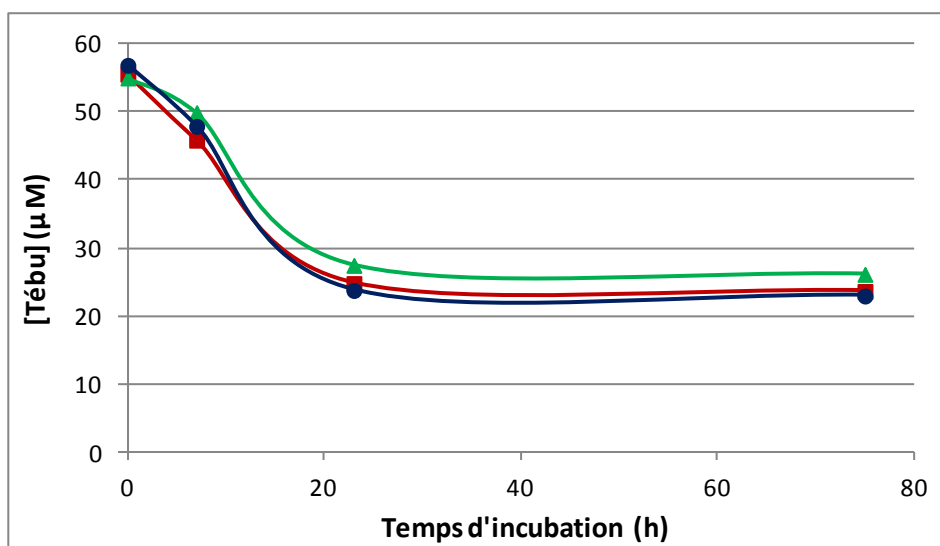


Figure 95 : Cinétiques globales de dissipation du tébuconazole (50 µM) par *Bacillus* sp. 3B6 avec différentes biomasses correspondant à 200 mL (■), 400 mL (▲) et 500 mL (●) de culture

Finalement, même si les processus de sorption rapide dépendent de la quantité de cellules, les cinétiques et les taux de dissipation sont très similaires quel que soit le nombre de cellules dans la gamme testée. Il semble donc qu'un composé présent dans le milieu puisse inhiber cette dissipation.

Nous nous sommes donc intéressés à l'identification des métabolites formés au cours de la biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6.

II.4. Identification des métabolites formés au cours de la biodégradation

II.4.1 Analyses par HPLC et LC/(+)ESI/MS

Lors du suivi cinétique de disparition du tébuconazole par HPLC, l'apparition de deux nouveaux pics est observée à des temps de rétention plus courts que le tébuconazole ($t_R \sim 23$ et 25 min), dont les aires augmentent au cours du temps (Figure 96). Ces nouveaux pics ne sont pas observés dans les prélèvements du témoin « cellules », ce qui laisse supposer qu'il s'agit de deux métabolites plus polaires du tébuconazole.

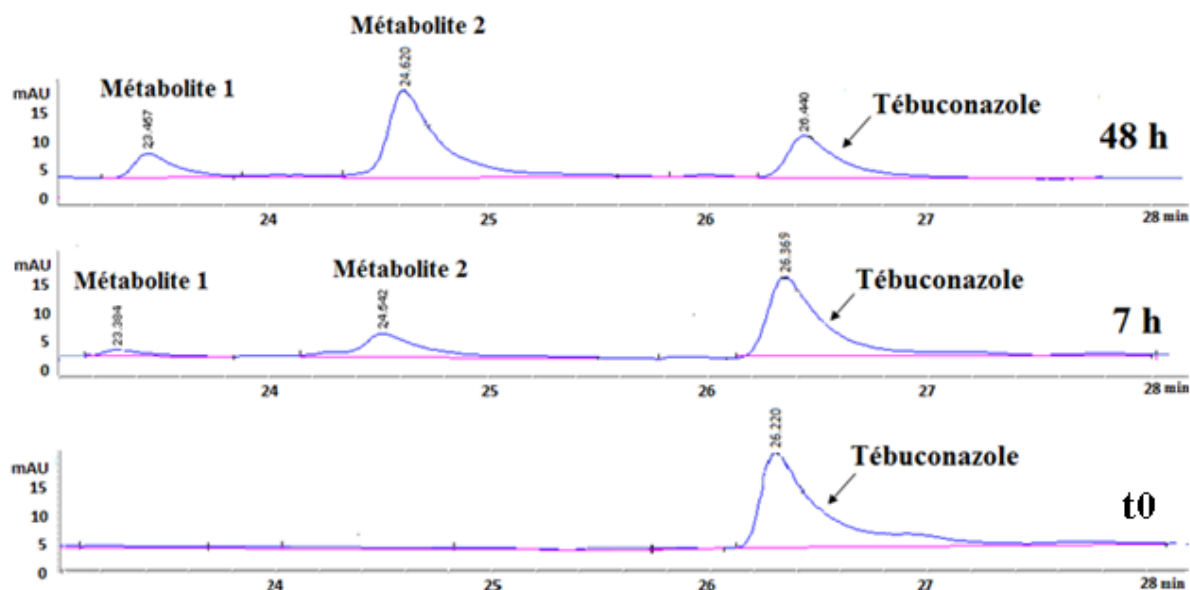


Figure 96 : Suivi par HPLC de la biodégradation du tébuconazole 50 μ M par la souche *Bacillus* sp. 3B6 et apparition des métabolites 1 et 2 (Méthode d'analyse HPLC mode gradient)

L'évolution de ces deux métabolites au cours du temps suivie par HPLC est reportée sur la Figure 97. La formation de ces deux métabolites est concomitante à la disparition du tébuconazole. Un plateau est atteint après 24-30h d'incubation.

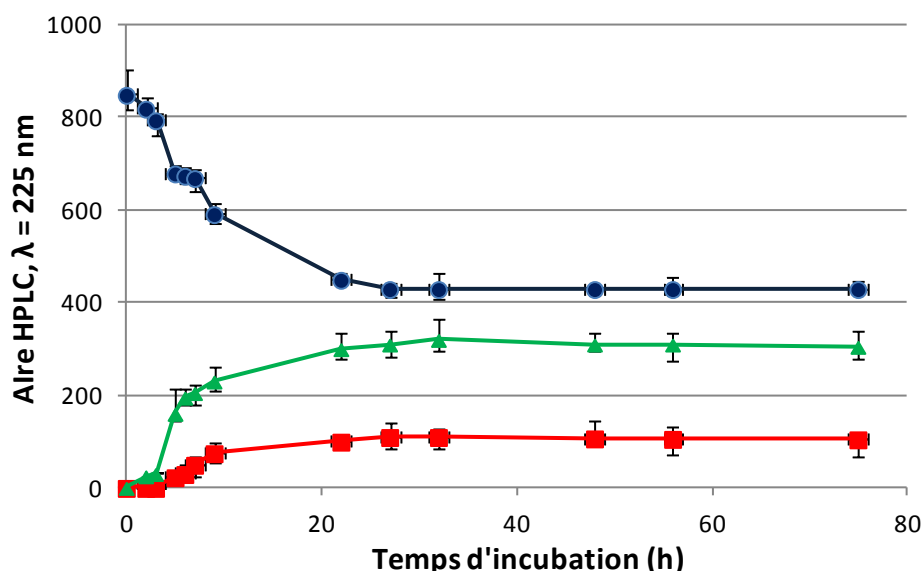


Figure 97 : Suivi par HPLC de la biotransformation du tébuconazole (50 μ M) et de l'apparition de deux métabolites par la souche *Bacillus* sp. 3B6 (lot 1) (●) Tébuconazole ; (■) Métabolite M1 (t_R = 23,4 min) ; (▲) Métabolite M2 (t_R = 24,6 min). (3 cultures indépendantes)

Afin d'identifier ces métabolites potentiels du tébuconazole, des échantillons prélevés à T0 et après 30 min, 33h et 80h d'incubation lors de la dégradation du tébuconazole (50 μ M)

par *Bacillus* sp. 3B6 (200 mL de culture) ont été analysés en LC/(+)-(ESI)-MS (cf. partie Matériels et Méthodes pour le détail des analyses). Après dilution par 10 de ces échantillons, les chromatogrammes obtenus sont les suivants (Figure 98) :

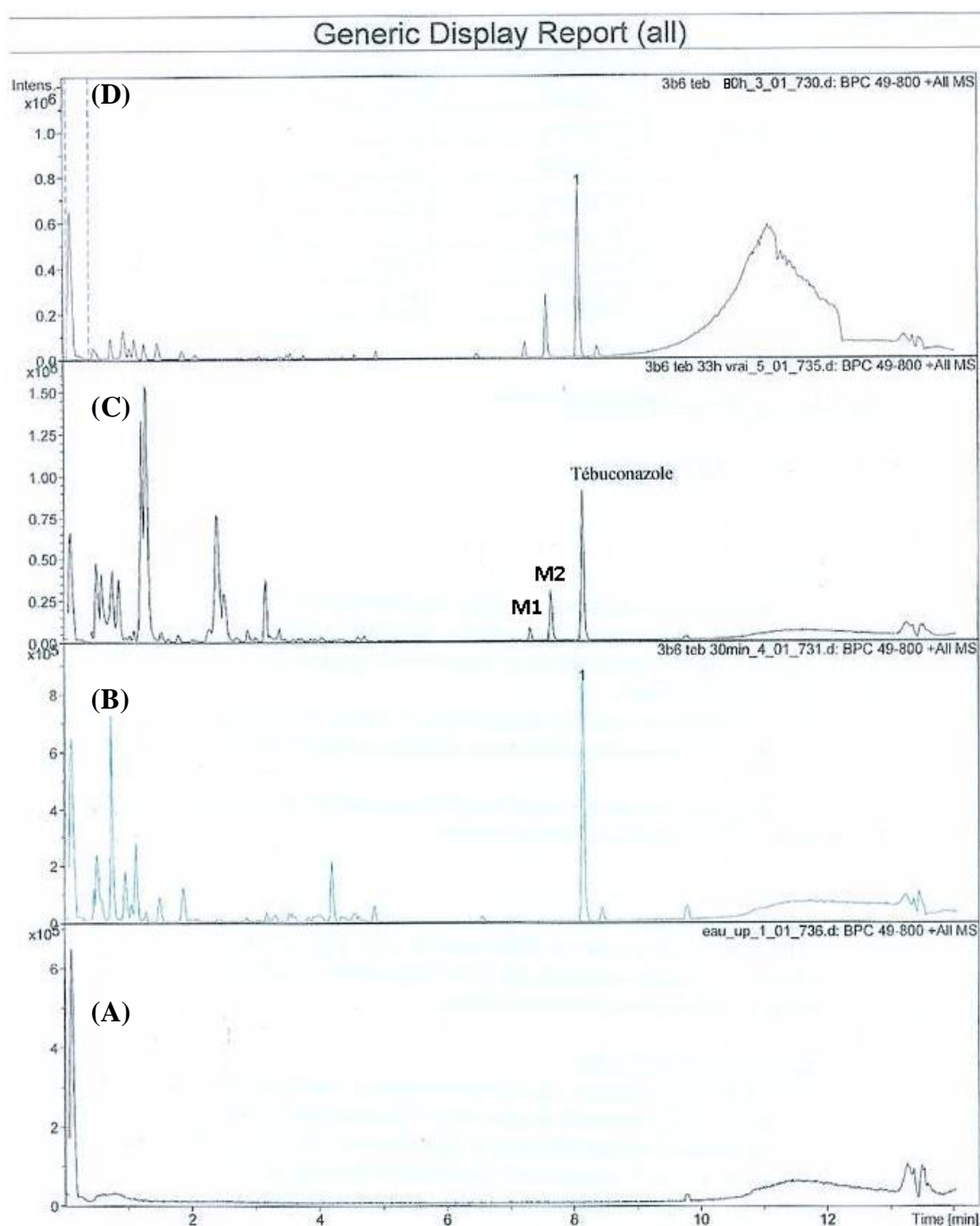


Figure 98 : Spectres obtenus par LC-(+)-ESI-MS lors de l'analyse des échantillons (A) d'eau ultrapure et prélevés lors de la biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6 après (B) 30 min, (C) 33h et (D) 80h d'incubation

Par comparaison avec les chromatogrammes obtenus pour les prélèvements réalisés aux mêmes heures d'incubation dans le témoin « cellules », trois nouveaux pics sont observés :

- deux pics bien visibles, notés **M1** et **M2** (Figure 98), qui présentent tous les deux une masse $m/z = 324$. Ils possèdent tous les deux un atome de chlore car nous observons des pics à 324 et 326 correspondant à l'abondance isotopique du chlore ($Cl_{35} = 75\%$; $Cl_{37} = 25\%$) (Figure 99). Cette caractéristique prouve qu'il s'agit de métabolites du tébuconazole, le chlore n'existant pas dans un environnement naturel à l'état libre. Ces deux composés ne peuvent donc pas provenir de la souche bactérienne. D'autre part, d'après la règle de l'azote inversée avec le mode d'ionisation, la masse paire obtenue permet de conclure que le cycle triazole n'a pas été touché.

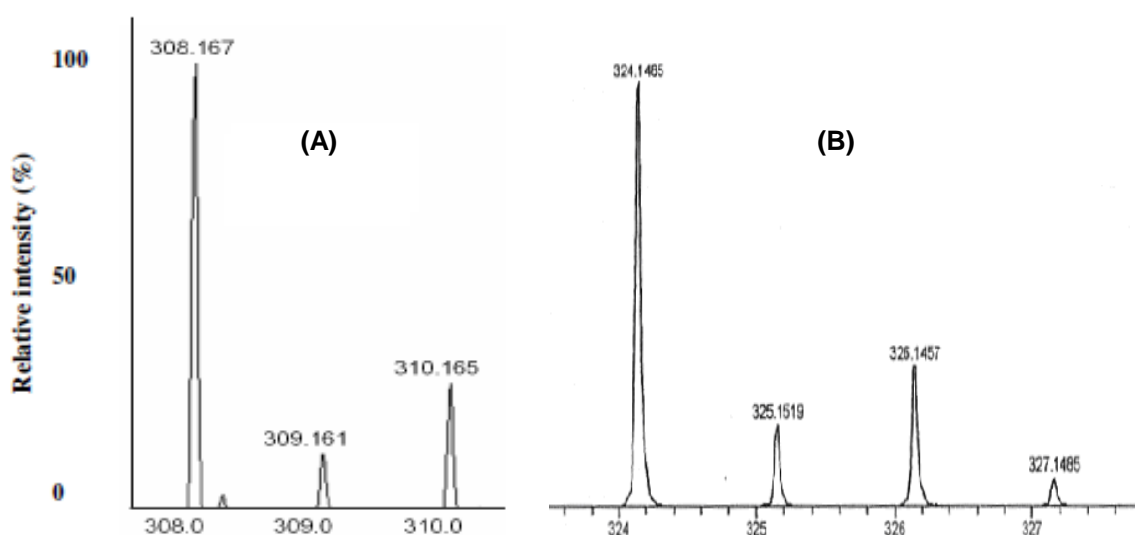


Figure 99 : Agrandissement de l'amas isotopique (A) du tébuconazole et (B) des métabolites **M1** et **M2**

La masse molaire de 323 g/mol correspond à une différence de 16 unités de masse par rapport à celle du tébuconazole (307 g/mol). Il s'agit très probablement de dérivés hydroxylés du tébuconazole (substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement hydroxyle). Plusieurs dérivés hydroxylés sur le noyau aromatique ou sur la chaîne aliphatique ont été décrits dans la littérature (Cf. Chapitre bibliographique sur le tébuconazole).

- Un pic d'intensité très faible à un temps de rétention de 7,9 min (très proche du tébuconazole) possédant une masse m/z de 306, correspondant à une perte de masse de 2 unités par rapport au tébuconazole ou de 18 ($-H_2O$) par rapport aux métabolites **M1** et **M2**. Ce composé **MB** est toujours chloré car nous observons deux pics à 306 et 308

correspondant à l'abondance isotopique du chlore ($Cl_{35} = 75\%$; $Cl_{37} = 25\%$) (Figure 100). Pour pouvoir perdre une molécule d'eau, le métabolite hydroxylé dont il est issu, doit posséder un hydrogène sur le carbone voisin. Ce métabolite ne peut donc être hydroxylé que sur la chaîne aliphatique du tébuconazole et non sur le noyau aromatique. D'autre part, ce composé **M3** ne semble pas se former lors d'un processus abiotique puisque sa concentration n'évolue pas entre 33 et 80h. Il s'agit donc bien d'un métabolite.

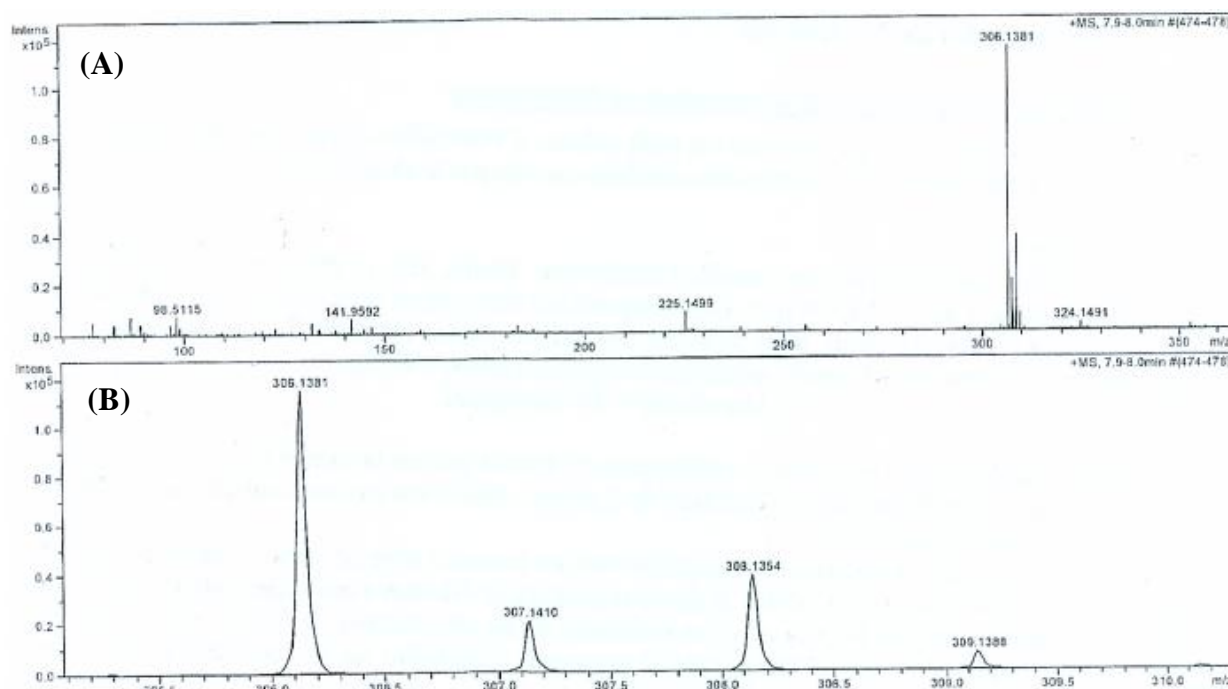


Figure 100 : Spectre de masse (A) et agrandissement de l'amas isotopique (B) du métabolite **M3**

Les hypothèses qui peuvent être émises pour la structure du métabolite **M3** et de son précurseur hydroxylé sont les suivantes (Figure 101):

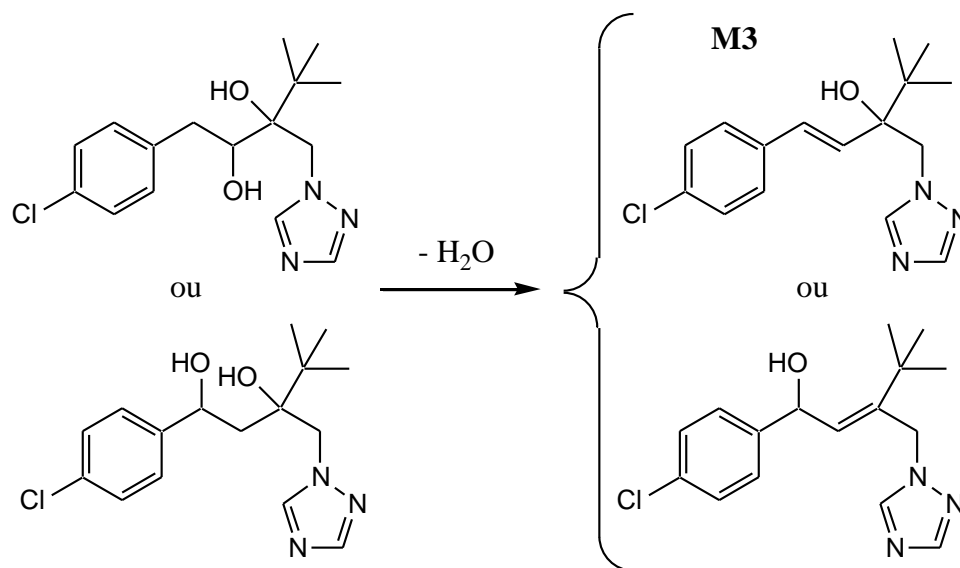


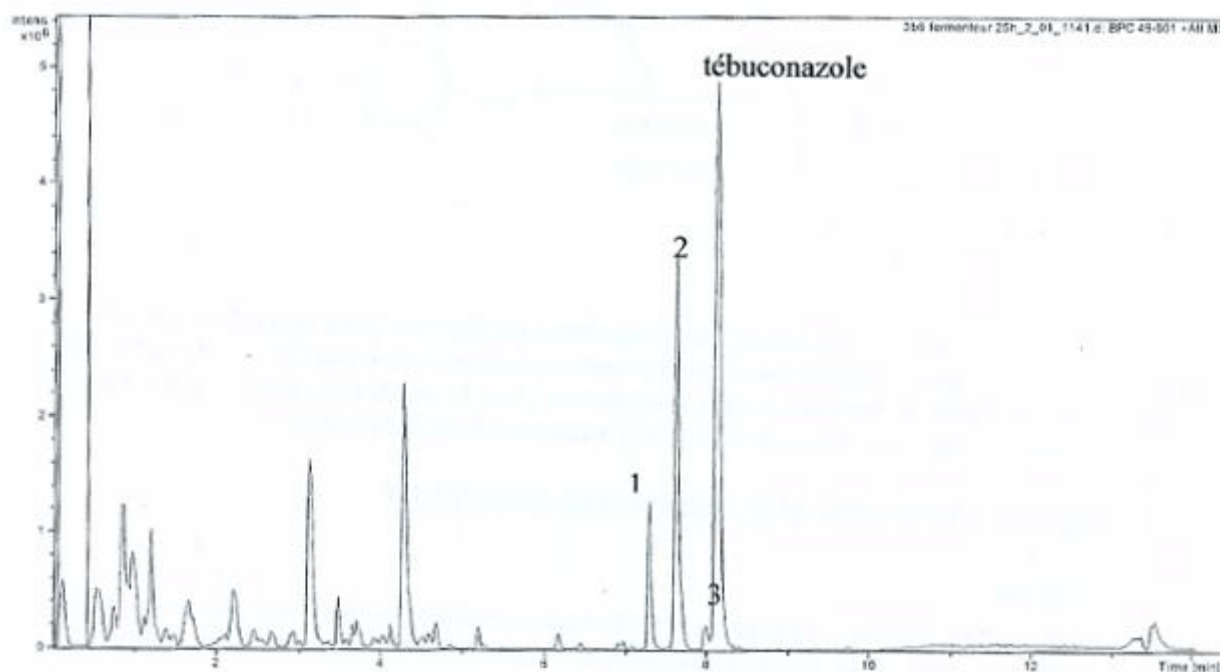
Figure 101 : Structures possibles pour le métabolite hydroxylé précurseur et M3

Il faut noter que des essais en GC/MS ont été réalisés sur une solution standard de tébuconazole et sur un surnageant de biodégradation. L'analyse a été effectuée sur un appareil GC/MS Agilent 6890 équipée d'une colonne 5% diphenyl - 95% diméthylpolysiloxane (15 m x 0,18 mm x 0,2 µm). La température de l'injecteur est de 250°C et le gradient de température utilisé est de 50°C à 350°C avec une vitesse de 10°C/min. Le spectromètre de masse (impact électronique ; 70 eV) est utilisé en mode « full scan ». Dans ces conditions, le pic observé dans les deux échantillons présente un rapport $m/z = 250$. Le tébuconazole semble s'être fragmenté du fait de la température élevée utilisée pour l'injecteur ou de la tension trop forte appliquée lors de l'ionisation. De plus, le bruit de fond est très intense et gênant pour détecter les métabolites. Cette méthode d'analyse, largement utilisée dans la bibliographie, a été abandonnée.

II.4.2 Analyses par RMN

Pour pouvoir identifier sans ambiguïté les structures chimiques des différents métabolites observés, une technique de choix est la RMN. Cependant, les échantillons dans ces expériences de biodégradation sont trop peu concentrés pour pouvoir utiliser directement cette méthode d'analyse. Nous avons donc réalisé un essai quantitatif de biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6 en fermenteur à partir de 4 L de culture (après

centrifugations et lavages, le culot bactérien est repris dans 1,5 L de tébuconazole 50 μM). Un témoin cellules a été réalisé en parallèle dans les mêmes conditions. Nous avons réalisé un suivi cinétique de la biodégradation par HPLC et après 25h d'incubation, la biodégradation est stoppée par centrifugation du milieu, puis extraction au chloroforme (50% de tébuconazole dégradé). Des essais préliminaires sur le protocole d'extraction avaient été réalisés sur des surnageants de biodégradation et avaient montré d'excellents taux d'extraction du tébuconazole et des deux principaux métabolites **M1** et **M2**. Après concentration des phases méthanoliques dans un ballon sur un évaporateur rotatif jusqu'à un volume de 5 mL environ, la solution est transférée dans un pilulier et évaporée à sec sur un rotavapeur. Le résidu est alors repris dans D_2O . Un échantillon est analysé par LC-(+)-ESI-MS afin de vérifier que les trois métabolites ont bien été extraits lors du protocole (Figure 102).



**Figure 102 : Spectre de masse LC-(+)-ESI-MS du résidu obtenu après extraction et repris dans l'eau.
1 : Métabolite 1, 2 : Métabolite 2, 3 : Métabolite 3**

Avant d'analyser par RMN les échantillons complexes obtenus, nous avons d'abord cherché à identifier les pics du tébuconazole en réalisant les spectres RMN ^1H et ^{13}C d'une solution standard concentrée dans le chloroforme deutéré. Les spectres RMN correspondants sont présentés sur la Figure 103.

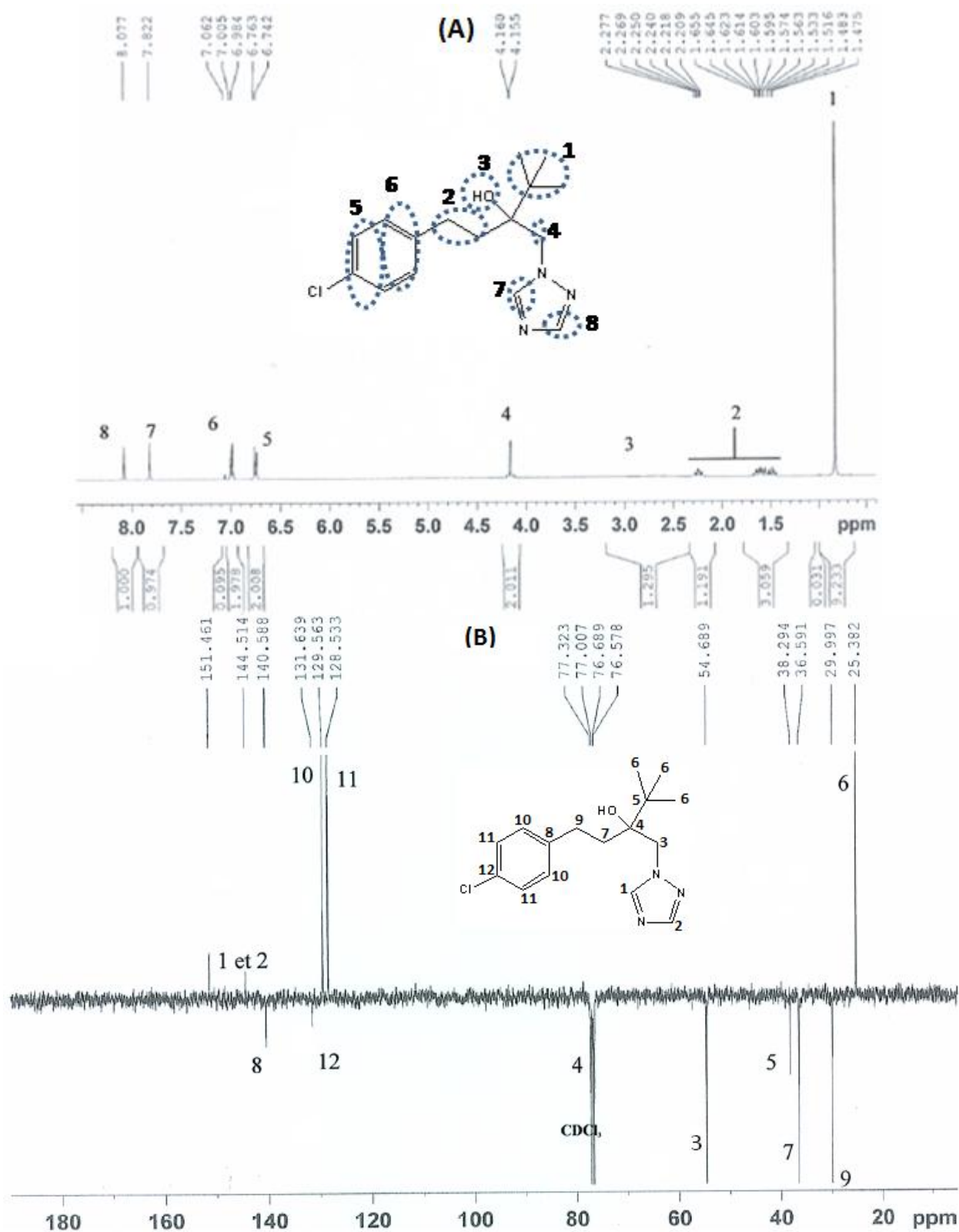


Figure 103 : Spectres RMN ^1H (A) et ^{13}C (JMOD) (B) du tébuconazole (dans CDCl₃)

L'échantillon complexe issu de l'extraction et de la concentration du prélèvement et repris dans CDCl_3 lors de la biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6 après 25h d'incubation a été également passé en RMN ^1H et ^{13}C . Le témoin « cellules » correspondant traité selon le même protocole a également été analysé. Les spectres RMN correspondants sont présentés sur les Figures 104 et 105.

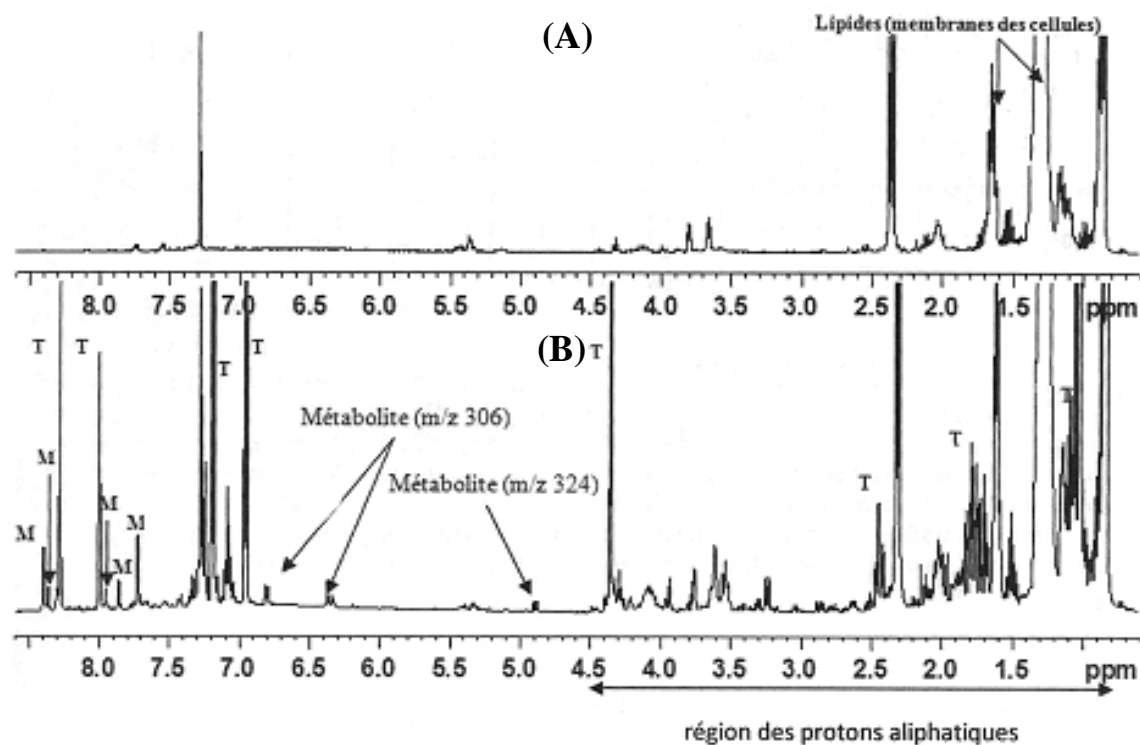


Figure 104 : Spectres RMN ^1H (A) du témoin cellules de *Bacillus* sp. 3B6 et (B) de l'échantillon de biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6 après 25h d'incubation (dans CDCl_3).

T = Tébuconazole ; M = Métabolites

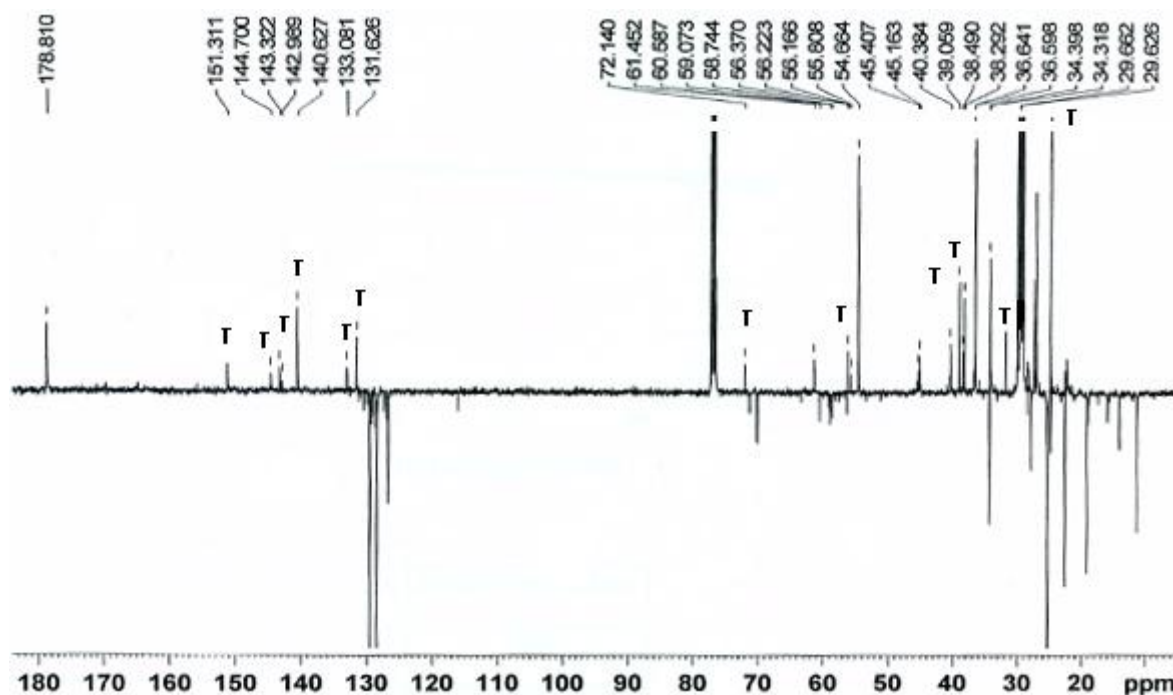


Figure 105 : Spectres RMN ^{13}C de l'échantillon de biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6 après 25h d'incubation (dans CDCl_3). T = Tébuconazole

Les spectres RMN deviennent beaucoup plus complexes, notamment du fait de l'extraction simultanée de composés cellulaires, en particulier de dérivés lipidiques issus des membranes, qui sont en concentrations beaucoup plus importantes que les métabolites du tébuconazole. Dans le spectre RMN ^1H , la région des protons aliphatiques devient particulièrement dense et complexe à analyser, même si la comparaison avec le témoin permet d'éliminer un certain nombre de pics dus aux cellules et non au tébuconazole ou à ses métabolites.

Pour obtenir des informations supplémentaires sur la structure des métabolites, nous avons réalisé la même panoplie d'analyses en RMN 2D que celle présentée précédemment (COSY ^1H - ^1H , NOESY ^1H - ^1H , HMQC ^1H - ^{13}C , HMBC ^1H - ^{13}C). Une analyse détaillée des tâches de corrélation observées sur chacun des spectres obtenus (Exemples sur les Figures 106 et 107) nous a permis d'établir les réseaux carbone-proton de chaque métabolite.

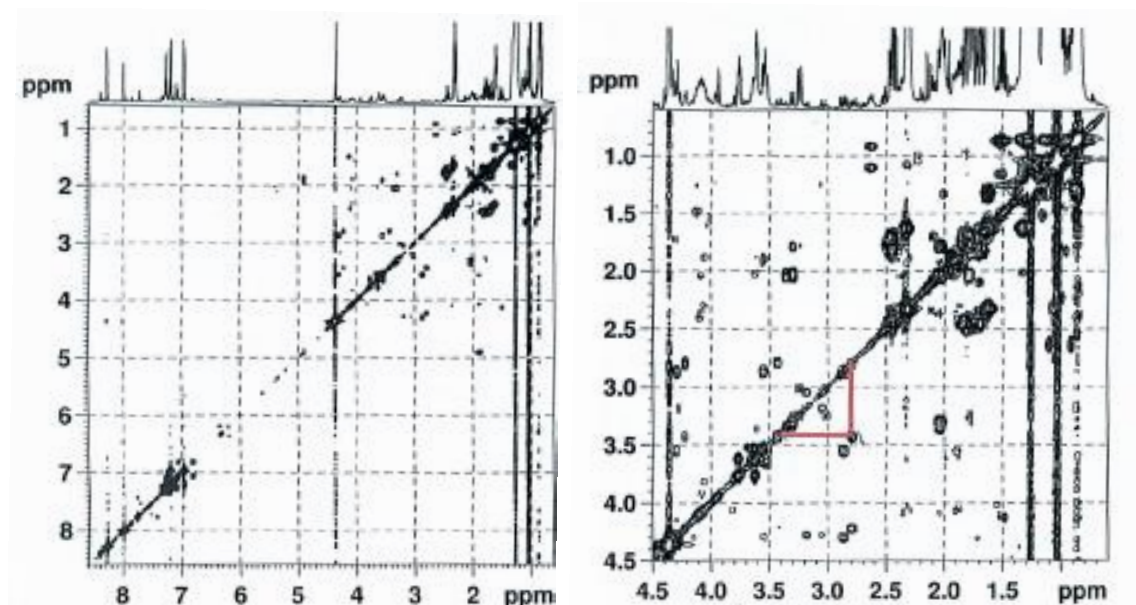


Figure 106 : Expérience COSY ^1H - ^1H de l'échantillon de biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6 après 25h d'incubation

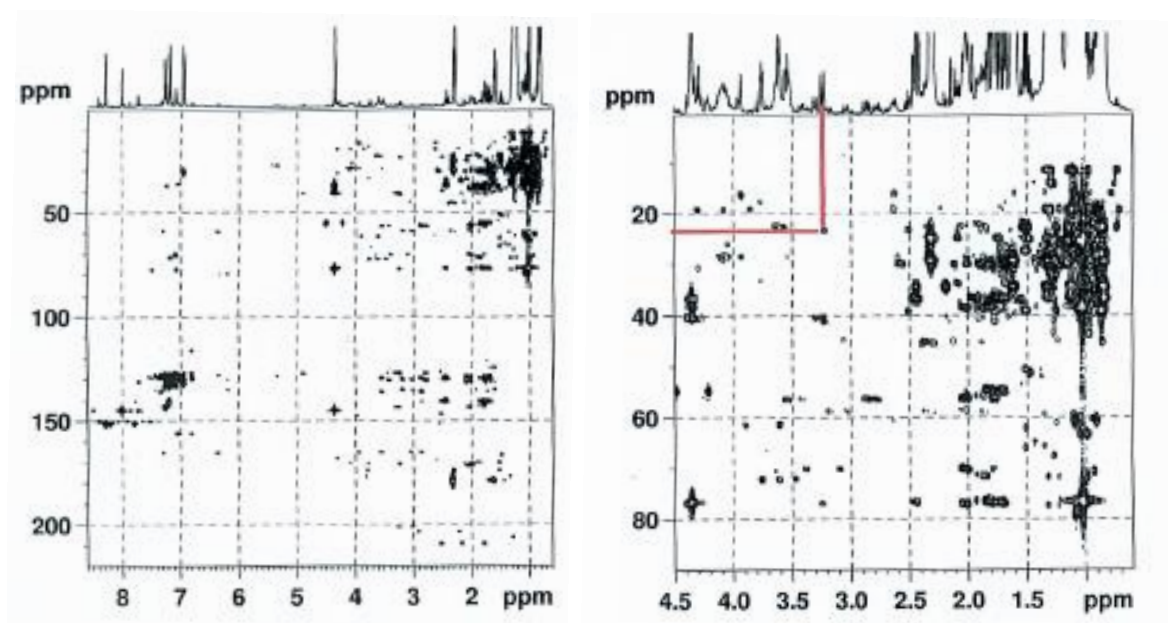


Figure 107 : Expérience HMBC ^1H - ^{13}C de l'échantillon de biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6 après 25h d'incubation

En combinant les données obtenues par les techniques complémentaires de LC/MS et de RMN 1D et 2D, nous avons pu identifier sans ambiguïté (analyses détaillées et identification de la structure chimique des métabolites réalisées par B. Combourieu, Professeur, Université de Lyon I) les structures chimiques des métabolites M1, M2 et M3 du tébuconazole (Figure 108).

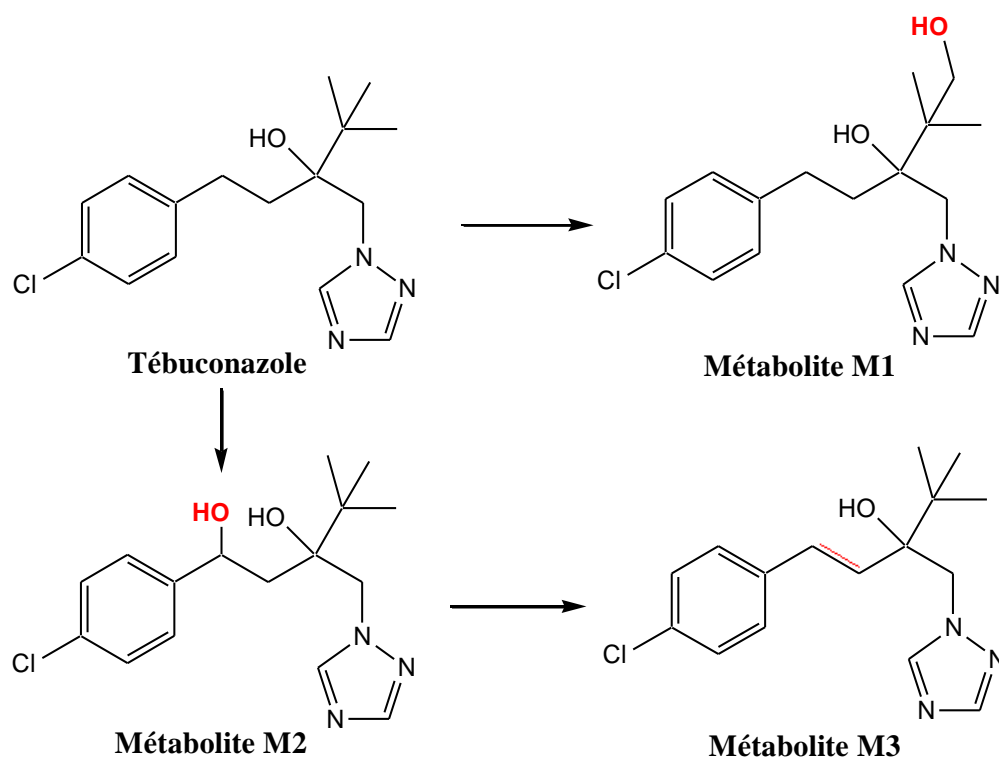


Figure 108 : Voies proposées de biodégradation du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6

Le métabolite **M1**, hydroxylé sur le groupement *t*-butyle, a déjà été décrit dans le métabolisme de nombreux organismes, qu'il s'agisse de mammifères (rat, chèvre), végétaux (blé) [FAO/WHO, 1994] ou de microorganismes : bactérie (*Pseudomonas fluorescens*) et champignons (*Trichoderma harzianum*, *Merialporia incrassata*) [Obanda *et al.*, 2009]. Le métabolite, **M2**, hydroxylé en α du noyau aromatique, a été décrit dans une étude de photodégradation du tébuconazole en présence de TiO_2 [Calza *et al.*, 2002]. Ces deux composés ont été identifiés par LC-MS/MS et IR. L'alcène **M3**, présent en très faible concentration, n'a jamais été décrit dans la littérature.

Remarque : Attention ! Il n'a pas été possible de déterminer de manière certaine qui était M1 et M2 sur les chromatogrammes HPLC. Nous avons donc attribué le nom de M1 au métabolite ayant le temps de rétention le plus court et M2 au deuxième.

II.5. Evolution des métabolites formés dans différentes conditions de biodégradation

N'ayant pas de standard de ces métabolites, il n'a pas été possible de les quantifier. D'après les spectres de masse obtenus (Figure 98) et en supposant que le taux d'ionisation de **M1** et **M2** soit similaire, le métabolite **M1** semble 2,5 à 3 fois moins concentré que **M2**.

Les suivis cinétiques d'apparition des métabolites **M1** et **M2** par HPLC (**M3** n'est pas détectable dans nos conditions d'analyse) ont montré une relative bonne reproductibilité des valeurs d'aire HPLC trouvées (Figure 109).

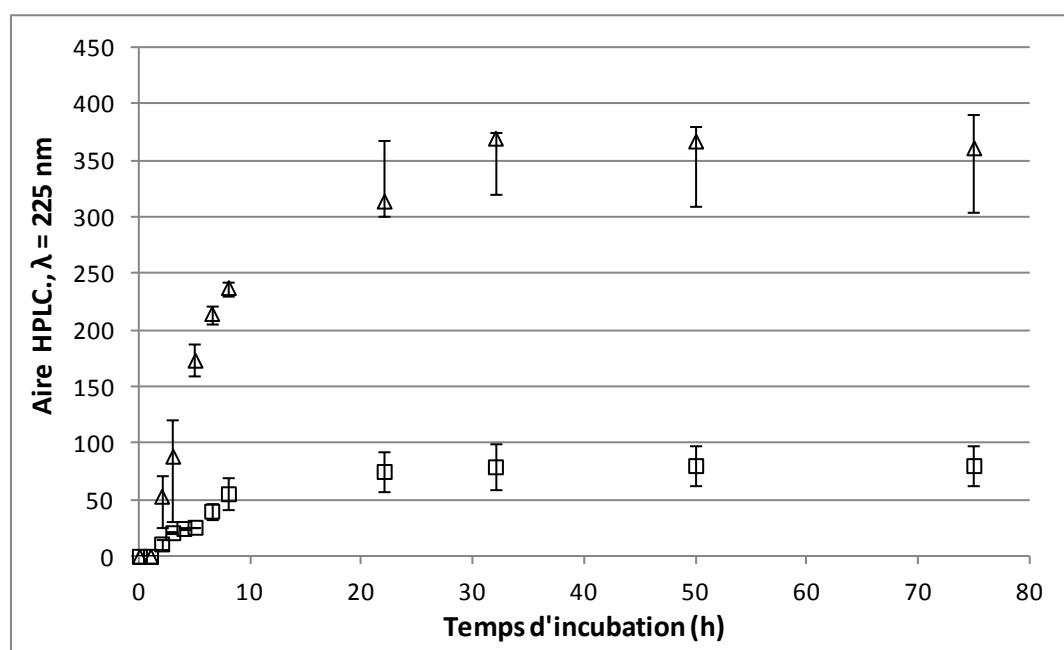


Figure 109 : Evolution des deux métabolites **M1** (□) et **M2** (△) au cours de la biodégradation du tébuconazole 50 µM par la souche *Bacillus* sp. 3B6. (3 cultures indépendantes)

Nous pouvons observer une courte phase de latence avant la détection des métabolites dans le surnageant. Nous avons précédemment montré que la souche *Bacillus* sp. 3B6 avait tendance à accumuler le tébuconazole à l'intérieur ou à la surface de la cellule. Nous avons donc recherché également les deux métabolites principaux **M1** et **M2** dans le culot bactérien, lors d'une expérience réalisée avec différentes quantités de biomasse (correspondant à 200, 400 et 500 mL de culture bactérienne). L'évolution des concentrations de **M1** et **M2** dans le surnageant et le culot bactérien (après extraction au méthanol), lors de la biodégradation du tébuconazole 50 µM, est présentée sur la Figure 110.

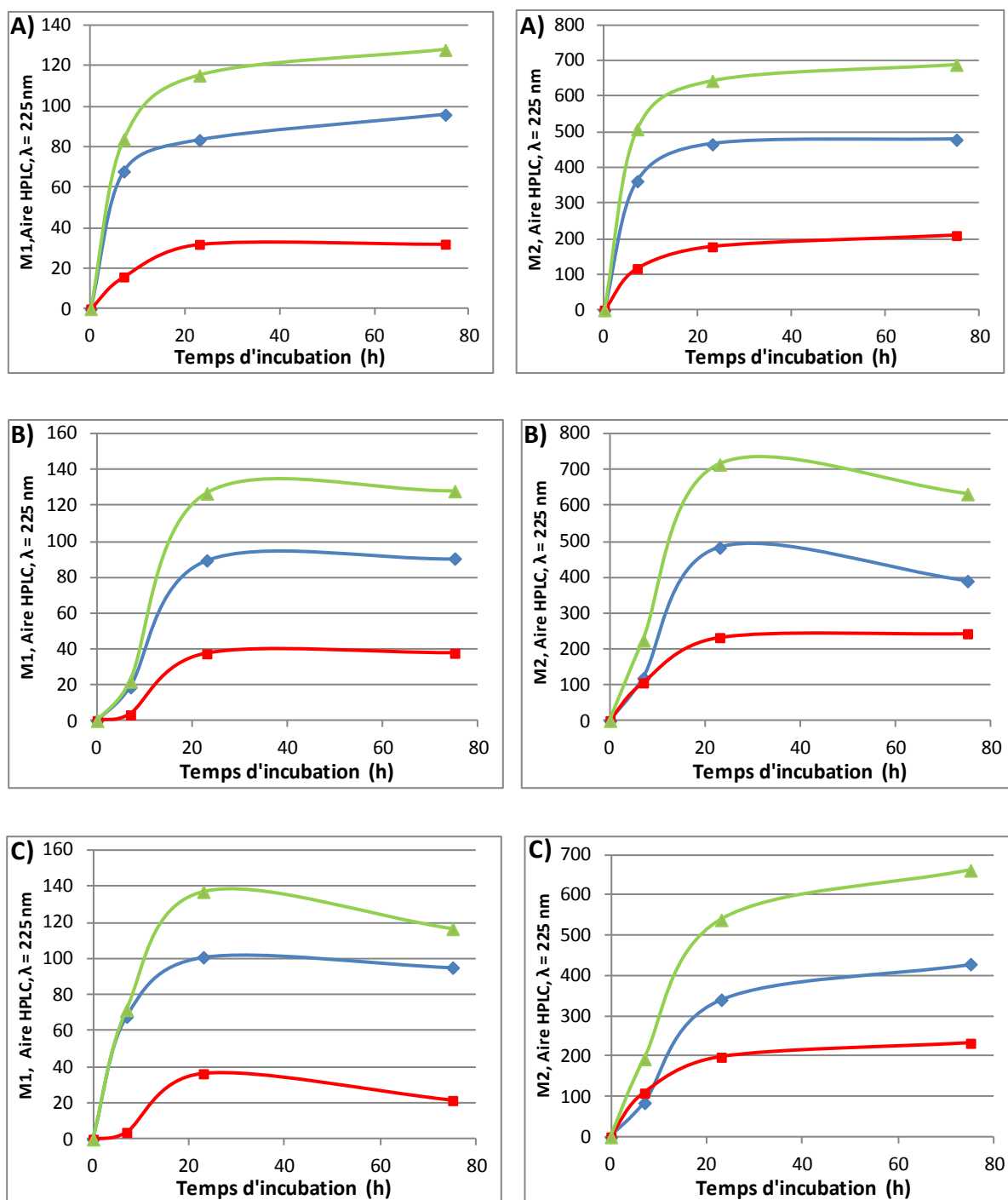


Figure 110 : Evolution des concentrations en M1 (colonne de gauche) et M2 (colonne de droite) dans le surnageant (◆) et dans le culot bactérien (■) lors de la biodégradation du tébuconazole 50  M par *Bacillus* sp. 3B6 avec différentes biomasses correspondant à (A) 200 mL, (B) 400 mL et (C) 500 mL de culture. (▲) Quantité totale en métabolites

Quelles que soient les conditions, une partie non négligeable (~ 30%) des métabolites se trouve dans le culot. L volution des cinétiques d apparition de ces métabolites est relativement similaire quelle que soit la biomasse. Nous retrouvons le fait que les cinétiques

de disparition du tébuconazole et d'apparition des métabolites sont peu influencées par la quantité de biomasse bactérienne présente avec une concentration similaire en fin de cinétique (Figures 94 et 110).

II.6. Conclusion sur les essais de biodégradation du tébuconazole pur par la souche *Bacillus* sp. 3B6

La souche *Bacillus* sp. 3B6, isolée d'eau de nuages prélevée au sommet du Puy de Dôme, biotransforme de manière incomplète (50 à 60%) et énantiosélective (ee =18%) le tébuconazole dans une large gamme de concentrations (de 1 à 100 μ M). Ce taux de biotransformation est indépendant de la concentration initiale en tébuconazole et en cellules. Un processus de biosorption est observé et suivant les concentrations présentes, le tébuconazole peut se trouver majoritairement sur/dans la cellule. La biotransformation atteint rapidement un plateau, quelle que soit la concentration initiale. Il semble qu'un métabolite puisse être toxique pour le microorganisme. Trois métabolites ont pu être identifiés : 2 dérivés hydroxylés du tébuconazole, dont un déjà décrit dans la littérature, et un composé, minoritaire, issu de la déshydratation d'un des dérivés précédents. Un nouveau schéma métabolique de dégradation a ainsi pu être mis en évidence.

III. Etude de la biodégradation du tébuconazole pur par les souches de *Pseudomonas*

Au cours du criblage initial, deux souches de *Pseudomonas*, *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648 et *Pseudomonas putida* ATCC 21244, ont montré un taux de biotransformation de respectivement 40 et 60% du tébuconazole 100 μ M. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier plus en détails le comportement biodégradatif de ces souches Gram négatif vis-à-vis du tébuconazole.

III.1. Etude de la biodégradation du tébuconazole par *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43468

III.1.1. Cinétiques de dissipation

Après 24h de culture sur milieu Trypcase-Soja (TS), la souche *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43468 (cellules au repos métabolique correspondant à 200 mL de culture) est incubée en présence de tébuconazole (100 mL) à deux concentrations : 10 et 50 μM . La température d'incubation est de 27°C. Des prélèvements réguliers de 1 mL sont effectués sur 5 jours d'incubation pour le suivi cinétique par HPLC. Un témoin correspondant à une suspension bactérienne en absence de tébuconazole est réalisé dans les mêmes conditions d'incubation afin de différencier les métabolites propres aux cellules de ceux issus de la biodégradation du fongicide.

Les cinétiques de disparition sont présentées sur la Figure 111. Elles montrent que cette souche est capable de dégrader partiellement le tébuconazole après une longue phase de latence (4 à 8h d'incubation), une étape de dégradation très lente (48h) et une phase de dégradation plus rapide. Les taux de dissipation du tébuconazole après 5 jours d'incubation sont d'environ 50% pour une concentration initiale de 10 μM et de 40% pour une concentration de 50 μM . Il faut noter que les concentrations initiales sont relativement proches de celles théoriques attendues.

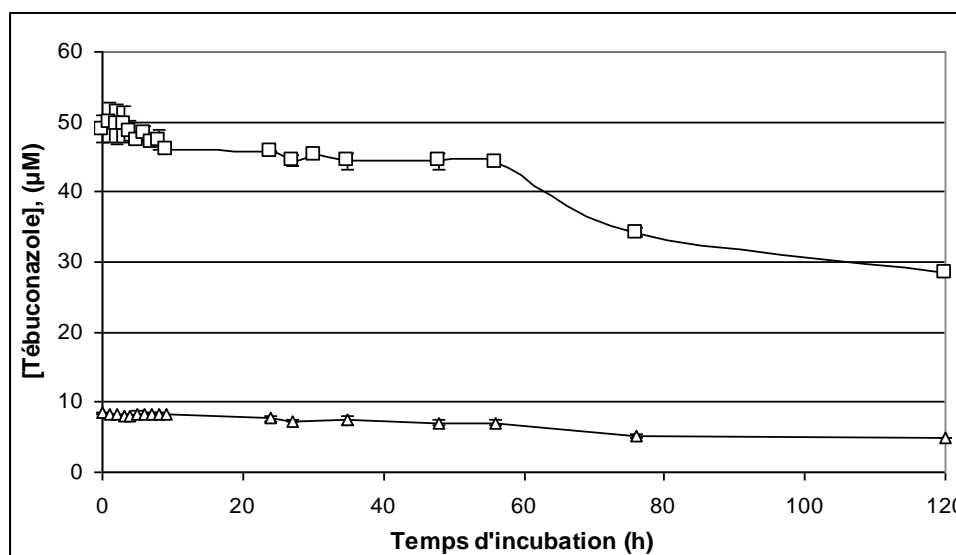


Figure 111 : Dissipation du tébuconazole 10 μM (Δ) et 50 μM (\square) par la souche *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43468 (3 cultures indépendantes)

Ces différentes phases de latence semblent correspondre à la mise en place du système enzymatique nécessaire à la biotransformation du tébuconazole. Comme précédemment, nous avons voulu étudier l'effet d'une augmentation de biomasse sur l'efficacité de la dissipation.

III.1.2. Influence de la biomasse sur la cinétique de dissipation du tébuconazole par *Pseudomonas* sp. C12B

Nous avons donc fait des essais en doublant la biomasse utilisée pour la dissipation du tébuconazole, en partant de 400 mL de culture au lieu de 200 mL. La Figure 112 présente une comparaison des cinétiques de disparition du tébuconazole 10 et 50 μM dans ces deux conditions.

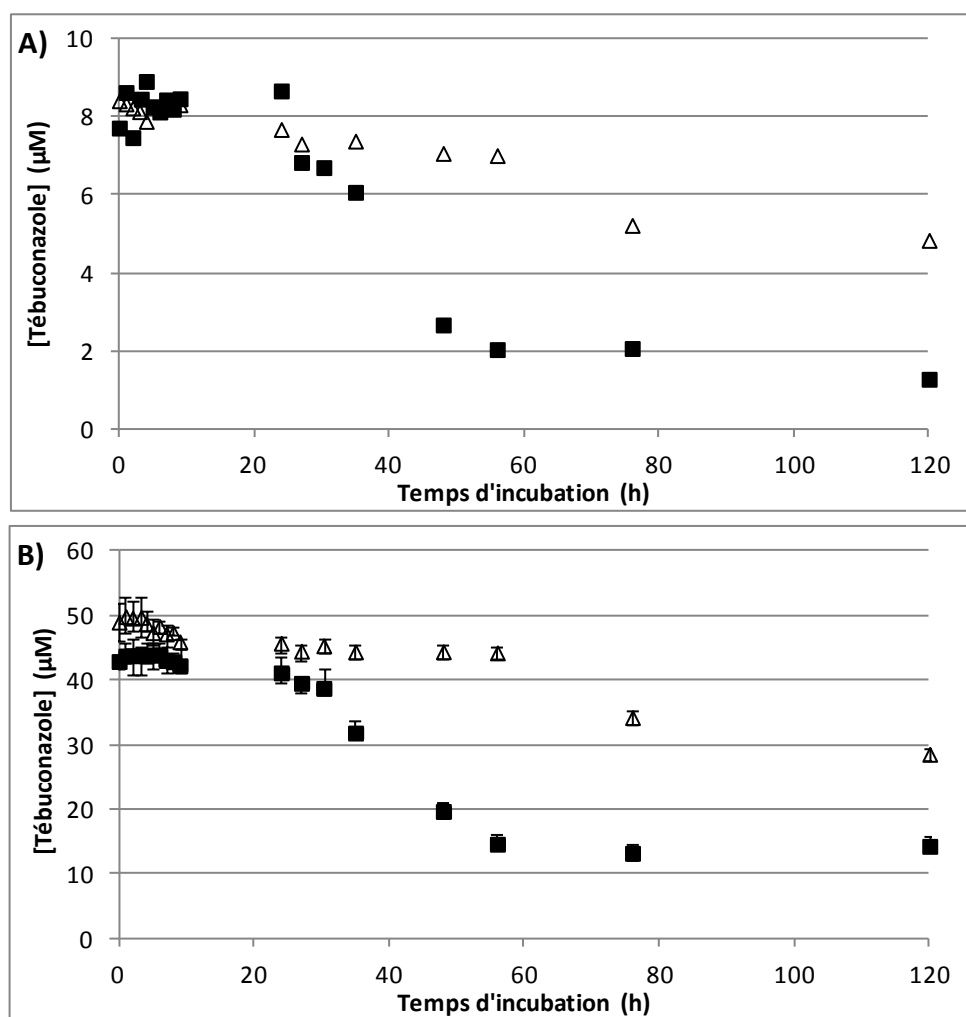


Figure 112 : Effet de la quantité de biomasse sur la dissipation du tébuconazole (A) 10 μM et (B) 50 μM par la souche *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648. Biomasse correspondant à 200 mL (Δ) et 400 mL (\blacksquare) de culture (3 cultures indépendantes pour B)

La Figure 112 montre une augmentation du taux de dissipation du tébuconazole par la souche *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648 quand la concentration de cellules bactériennes est doublée. Le temps de latence est le même (~ 8h), tandis que la phase de dégradation lente est raccourcie (30h) et que la phase rapide est beaucoup plus importante. Ainsi, le taux de la dissipation du tébuconazole est largement augmenté (80% au lieu 40% pour une concentration initiale en tébuconazole de 50 μ M) et quasiment proportionnel à la quantité de cellules. Ce taux est 2 fois plus important en présence de 2 fois plus de cellules.

Donc, contrairement aux résultats obtenus avec la souche *Bacillus* sp. 3B6, l'efficacité de cette souche de *Pseudomonas* dépend directement de la biomasse bactérienne présente.

III.1.3. Identification des métabolites formés

Lors du suivi HPLC des cinétiques de dissipation, aucun nouveau pic n'a été observé. Des modifications de méthode d'analyse (gradient, colonne) n'ont pas non plus permis de mettre en évidence la formation de métabolites dans le surnageant. Nous avons réalisé des extractions au méthanol du culot bactérien en fin de cinétique pour voir si les métabolites du tébuconazole étaient restés dans le contenu intracellulaire. Aucun pic visible en HPLC, différent de ceux observés après extraction d'un culot bactérien de cellules seules, n'a été détecté dans nos conditions d'analyse.

III.2. Etude de la biodégradation du tébuconazole pur par *Pseudomonas putida* ATCC 21244

III.2.1. Cinétiques de dissipation

Comme précédemment, après 24h de culture sur milieu Trypcase-Soja (TS), la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244 (cellules au repos métabolique correspondant à 200 mL de culture) est incubée en présence de tébuconazole (100 mL) à trois concentrations : 10, 50 et 70 μ M. La température d'incubation est de 27°C. Des prélèvements réguliers de 1 mL sont effectués sur 5 jours d'incubation pour le suivi cinétique par HPLC. Un témoin correspondant à une suspension bactérienne en absence de tébuconazole est réalisé dans les mêmes conditions d'incubation afin de différencier les métabolites propres aux cellules de ceux issus de la biodégradation du fongicide.

Les cinétiques de disparition du tébuconazole sont présentées sur la Figure 113.

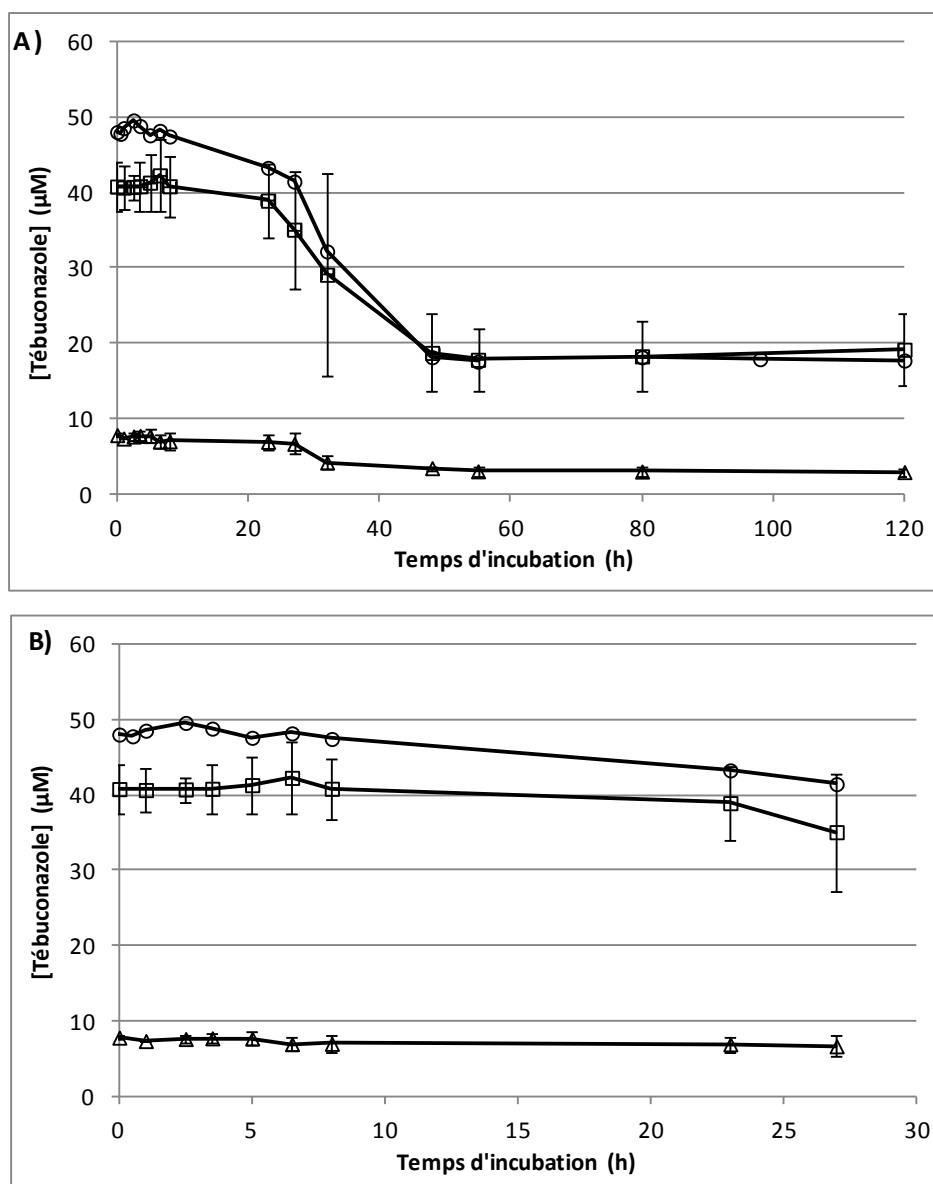


Figure 113 : Cinétiques de dissipation par la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244 (A) du tébuconazole à 10 μM (Δ), 50 μM (\square) et 70 μM (\circ) et agrandissement (B) de la zone des premières heures d'incubation (3 cultures indépendantes)

La Figure 113 montre que cette souche est capable de dissiper partiellement le tébuconazole après une phase de latence (~ 8 h d'incubation), une étape de disparition très lente (22 h) puis rapide pour atteindre ensuite un plateau après 56 h d'incubation. Le taux de dissipation du tébuconazole est relativement indépendant de la concentration en tébuconazole initiale et varie de 60 à 70%.

Il faut remarquer également qu'avec cette souche, les concentrations initiales de tébuconazole mesurées sont inférieures à celles théoriques attendues : 8 μM au lieu de 10 μM , 40 μM au lieu de 50 μM et 48 μM au lieu de 70 μM . Il s'agit là encore d'un processus de

biosorption que nous avons pu mettre en évidence par extraction du culot au méthanol et analyse des extraits méthanoliques. En additionnant les concentrations trouvées dans ces deux compartiments, nous retrouvons les concentrations initiales attendues. Les cinétiques de disparition du tébuconazole dans le surnageant et dans le culot sont similaires à celles observées précédemment avec la souche *Bacillus* sp. 3B6.

III.2.2. Influence de la biomasse sur la cinétique de dissipation du tébuconazole par *Pseudomonas putida*

Nous avons étudié l'influence de la biomasse bactérienne sur la cinétique et le taux de disparition du tébuconazole 10 μM et 50 μM par *Pseudomonas putida* ATCC 21244 en comparant, sur une même culture, une biomasse correspondant à 200 et 400 mL de culture. Les cinétiques comparées sont présentées sur la Figure 114.

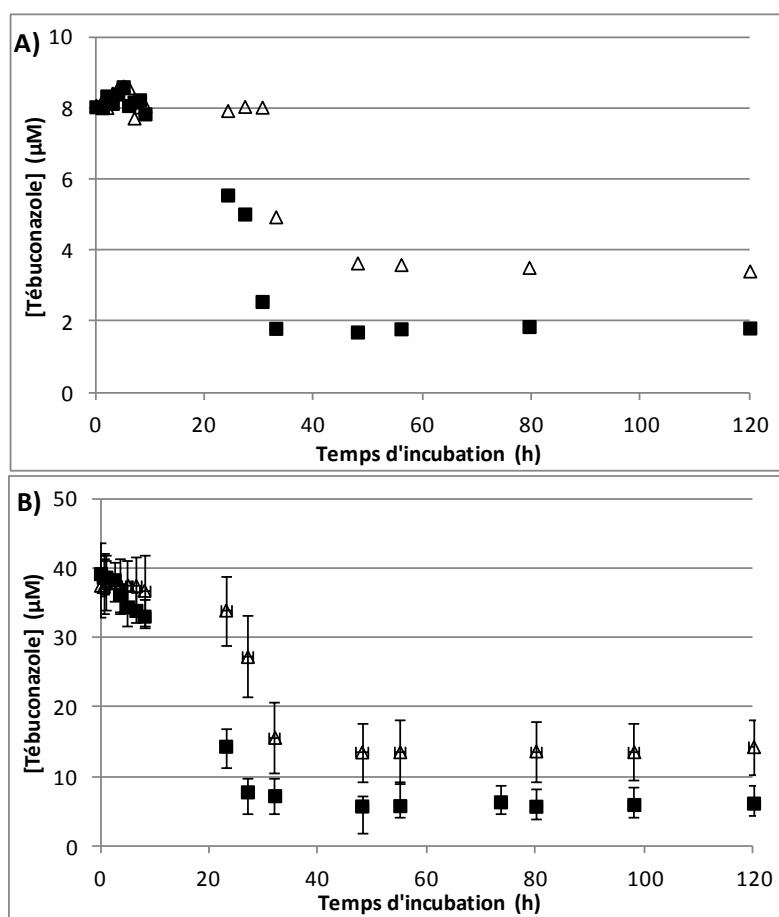


Figure 114 : Effet de la quantité de biomasse sur la disparition du tébuconazole (A) 10 μM et (B) 50 μM par la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244. Biomasse correspondant à 200 mL (Δ) et 400 mL (\blacksquare) de culture (3 cultures indépendantes pour B)

Le doublement de la biomasse bactérienne (avec un passage de 200 mL de culture, conditions classiques, à 400 mL) entraîne une diminution de la phase de latence et une légère augmentation du taux de dissipation du tébuconazole, qui n'atteint pas cependant 100% (environ 80% avec les deux concentrations testées). Le plateau correspondant à l'arrêt de la dissipation est également atteint plus rapidement. Il y a donc un effet de la quantité de biomasse présente sur la dissipation du tébuconazole mais qui n'est pas, dans ce cas, du tout proportionnel au nombre de cellules. Nous retrouvons par contre le fait que le taux de dissipation est quasiment indépendant de la concentration initiale testée.

III.2.3. Identification des métabolites formés

Lors des suivis cinétiques par analyse HPLC, aucun nouveau pic n'a été détecté et ce, même en changeant les conditions d'analyse. Cette souche étant plus efficace en termes de cinétique de dissipation que *Pseudomonas* sp. C12B, nous avons décidé de faire une expérience quantitative en gros volume pour essayer de visualiser d'éventuels métabolites en concentrant le surnageant d'une part et en extrayant le culot d'autre part.

Cet essai est réalisé dans un fermenteur à partir de 2 L de culture. Après centrifugation et lavages, le culot bactérien est remis en suspension dans 1,5 L de solution de tébuconazole 100 μ M. L'expérience est réalisée sous agitation et aération continue, à une température de 27°C. Un témoin cellules est réalisé en parallèle dans les mêmes conditions. Un suivi par HPLC est effectué régulièrement pour observer l'état d'avancement de la réaction. L'incubation est arrêtée lorsque la cinétique de dissipation du tébuconazole atteint son plateau après 23h d'incubation avec un taux de 55 %. Le surnageant est séparé en deux parties : l'une d'elle est directement concentrée par évaporation à froid dans un SpeedVac ; l'autre est extraite avec du chloroforme. Le culot bactérien, lui, est mis à agiter vigoureusement en présence de méthanol pendant une nuit. Après évaporation du solvant, le résidu est repris, dans tous les cas, par 1 mL de chloroforme deutéré en vue de l'analyse RMN. Le même protocole est suivi pour le témoin cellules.

Les spectres RMN ^1H des extraits chloroformiques du surnageant et du culot bactérien obtenus lors de la dissipation du tébuconazole 100 μM par *Pseudomonas putida* sont présentés sur les Figures 115 et 116, respectivement, et sont comparés avec les spectres correspondants du témoin cellules.

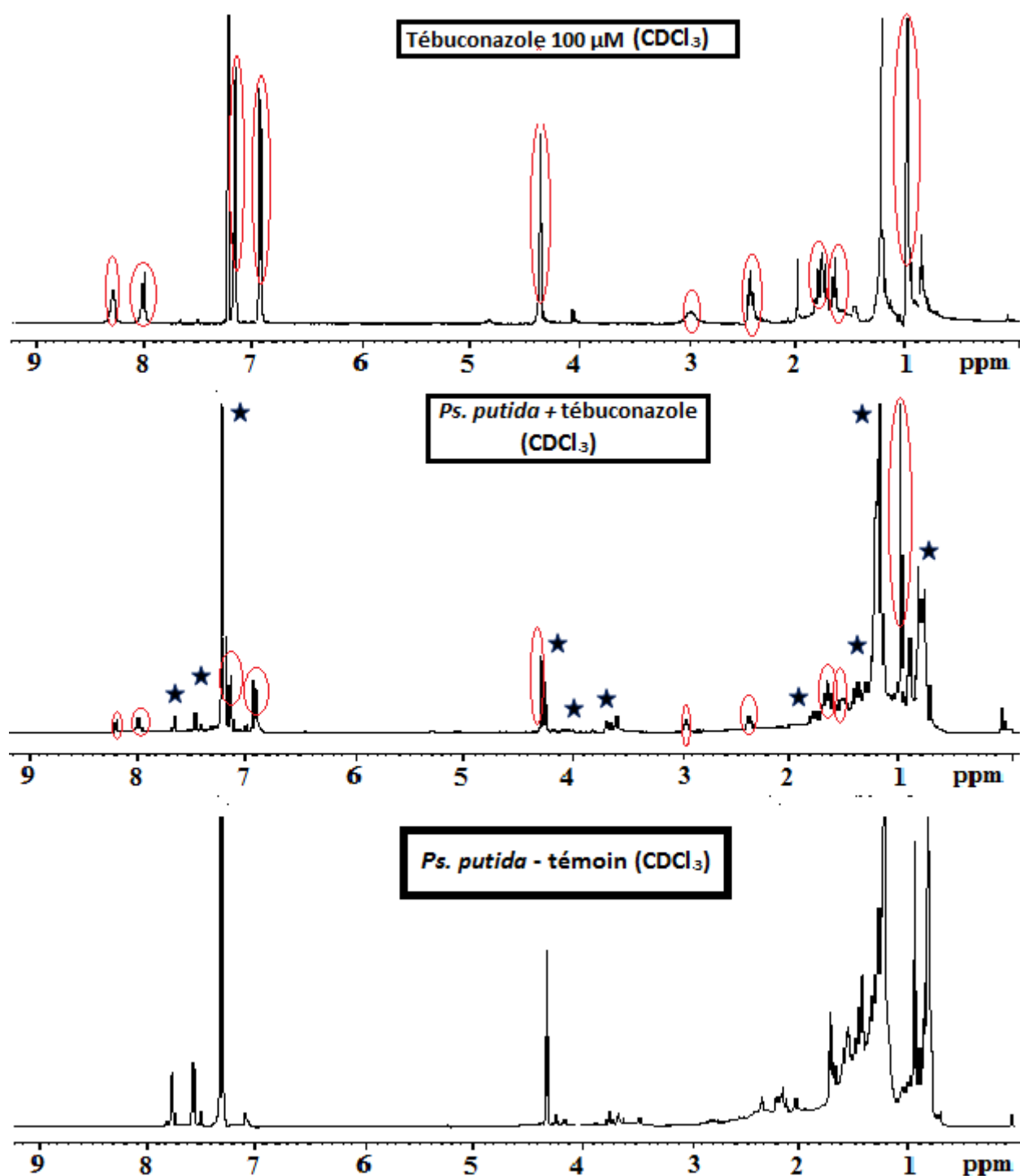


Figure 115 : Spectres RMN ^1H réalisés dans CDCl_3 en haut : d'une solution de tébuconazole 100 μM ; au milieu : du surnageant de dissipation du tébuconazole (100 μM) par la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244 obtenu après 23h d'incubation et en bas : du surnageant d'un témoin cellules obtenu après 23h d'incubation. Les signaux correspondant au tébuconazole sont entourés en rouge et ceux correspondant au témoin « cellules » sont surmontés d'une étoile (★).

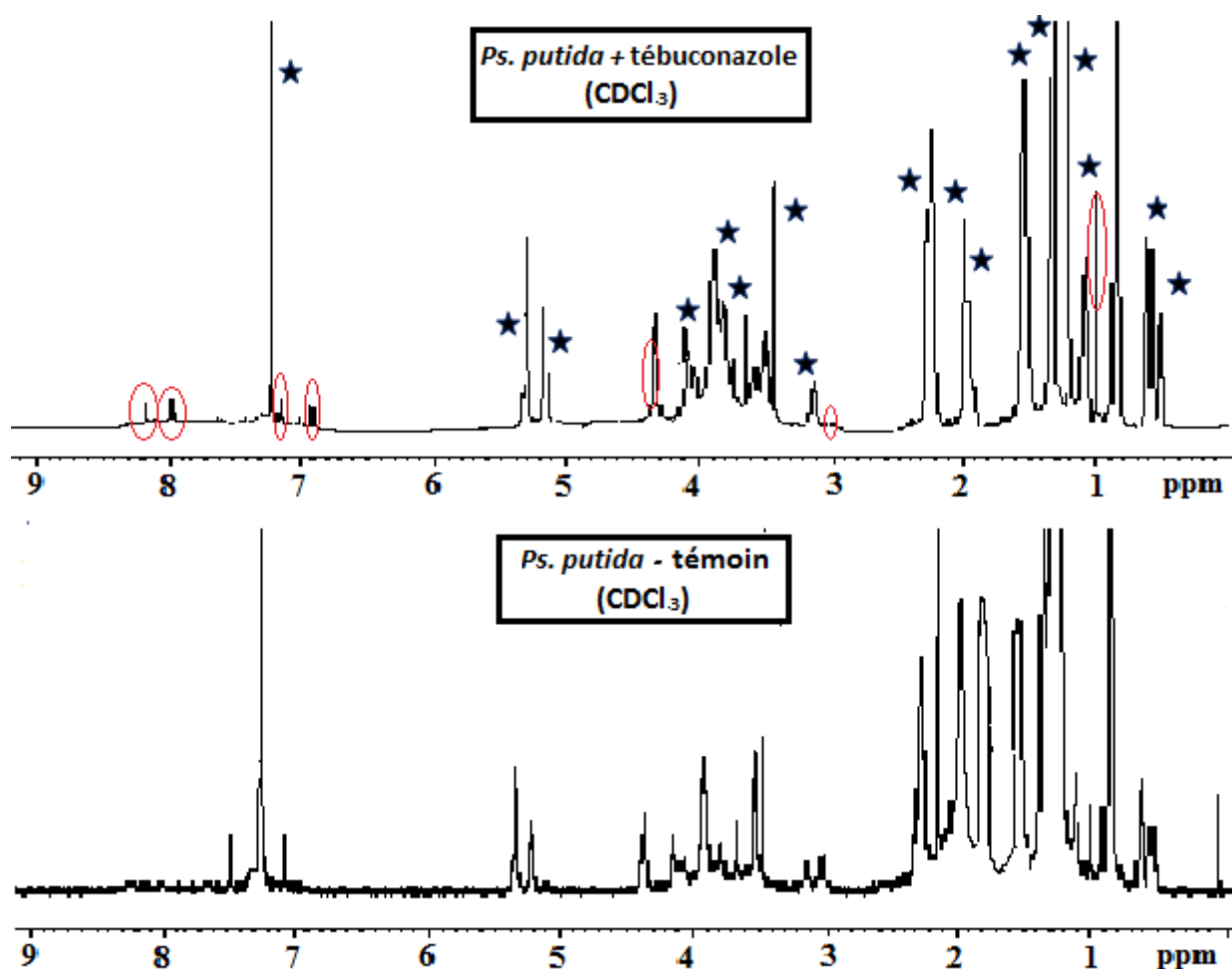


Figure 116 : Spectres RMN ^1H réalisés dans CDCl_3 d'extraits méthanoliques du culot bactérien de *Pseudomonas putida* ATCC 21244 obtenu après 23h d'incubation lors de la dissipation du tébuconazole (100 μM) (en haut) et d'un témoin cellules (en bas). Les signaux correspondant au tébuconazole sont entourés en rouge et ceux correspondant au témoin « cellules » sont surmontés d'une étoile (★).

La comparaison des spectres de l'échantillon de dissipation avec celui du témoin « cellules » ne montre aucun nouveau pic de manière clairement visible. Il semble donc qu'aucun métabolite ne soit présent dans la phase chloroformique, malgré le fort facteur de concentration.

Nous avons également analysé la phase aqueuse (surnageant) directement concentrée de l'échantillon « biodégradation » et de celui « témoin cellules », afin de vérifier que de potentiels métabolites n'avaient pas été extraits par le chloroforme ou s'étaient volatilisés durant le protocole d'extraction. Ici, la concentration a été réalisée dans un SpeedVac sans chauffer. Le résidu n'a jamais été amené à sec et repris régulièrement par D_2O . Les spectres RMN ^1H obtenus sont présentés sur la Figure 117.

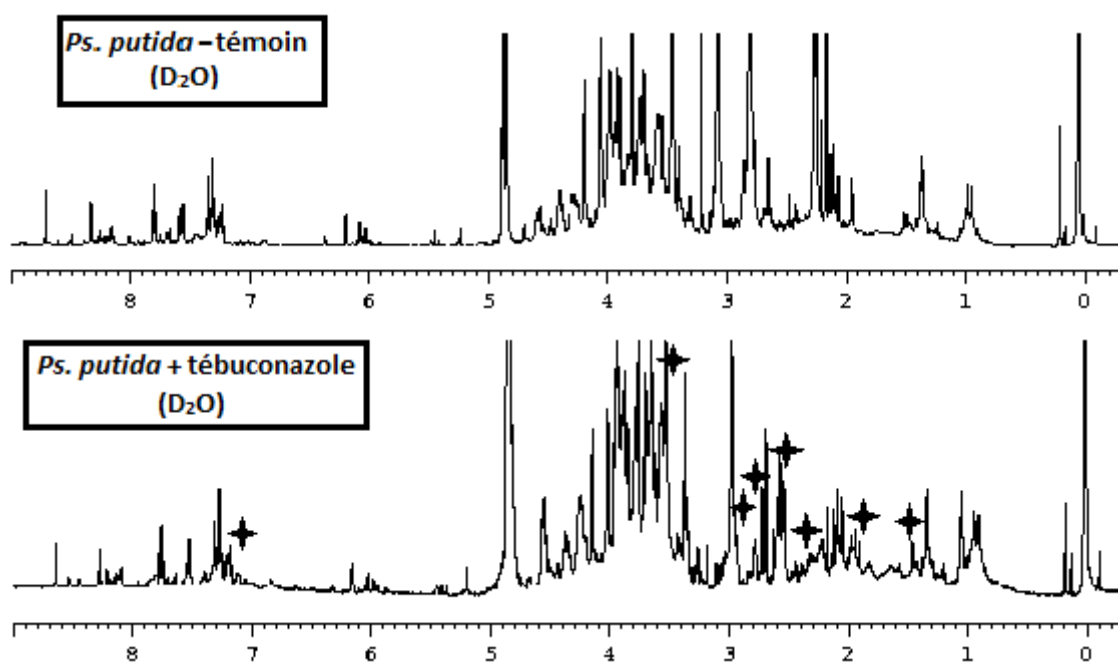


Figure 117 : Spectres RMN ^1H réalisés dans D_2O du surnageant concentré d'un échantillon obtenu après 23h d'incubation lors de la dissipation du tébuconazole ($100\ \mu\text{M}$) par *Pseudomonas putida* ATCC 21244 (en bas) et d'un témoin « cellules » obtenu dans les mêmes conditions (en haut). Les signaux correspondant au tébuconazole sont surmontés d'une étoile (♦).

Le spectre RMN ^1H du témoin « cellules » présente de très nombreux signaux intenses, correspondant à tous les composés cellulaires concentrés, eux aussi, et rendant difficile la visualisation potentielle d'autres pics. Une étude attentive d'agrandissements des différentes zones du spectre n'a pas permis de mettre en évidence des pics autres que ceux du tébuconazole, quand même identifiables, dans l'échantillon de biodégradation.

Il semble donc qu'aucun métabolite du tébuconazole ne soit détecté par injection directe sur HPLC ou par analyse après concentration par RMN ^1H . Aucun métabolite ne semble s'accumuler et les intermédiaires ont soit un temps de vie très court, soit sont présents en très faible concentration.

III.3. Conclusion sur les essais de biodégradation du tébuconazole pur par les souches de *Pseudomonas*

Les deux souches de *Pseudomonas* testées, *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648 et *Pseudomonas putida* ATCC 21244, biotransforment de manière incomplète le tébuconazole

sur une large gamme de concentrations (de 1 à 100 μM) après une longue phase de latence (plus d'une dizaine d'heures), permettant sans doute la mise en place du système enzymatique de dégradation. Le taux de biotransformation croît avec l'augmentation de la biomasse mais n'est jamais de 100%. Aucun métabolite n'a pu être mis en évidence par analyse directe en HPLC, ni par analyses, après extraction et concentration du surnageant et du culot, en RMN ^1H . Deux hypothèses peuvent être émises : (i) les métabolites restent en concentration très faibles; (ii) ces deux souches minéralisent le tébuconazole. Des essais de respirométrie (tébuconazole ^{14}C) devront être réalisés pour trancher entre ces deux hypothèses.

IV. Etude de l'effet de la formulation (Balmora®) sur la biodégradation du tébuconazole par les souches bactériennes dégradantes

Comme précédemment, nous avons donc voulu étudier l'effet de la formulation, et donc des adjuvants, sur la biodégradation du tébuconazole par nos deux souches les plus efficaces (*Bacillus* sp. 3B6 et *Pseudomonas putida*). Pour ce faire, nous avons travaillé avec la formulation Balmora®, qui contient 250 g/L de tébuconazole. D'après sa fiche de sécurité [Article 31, 1907/2006/CE], le Balmora® contient du N,N-diméthyl-décaneamide à plus de 25% (W/W) et d'autres additifs non précisés et désignés comme non toxiques, le tébuconazole étant à 26% W/W. Le spectre RMN ^1H d'une solution de Balmora®, contenant 300 μM de tébuconazole est présenté sur la Figure 118.

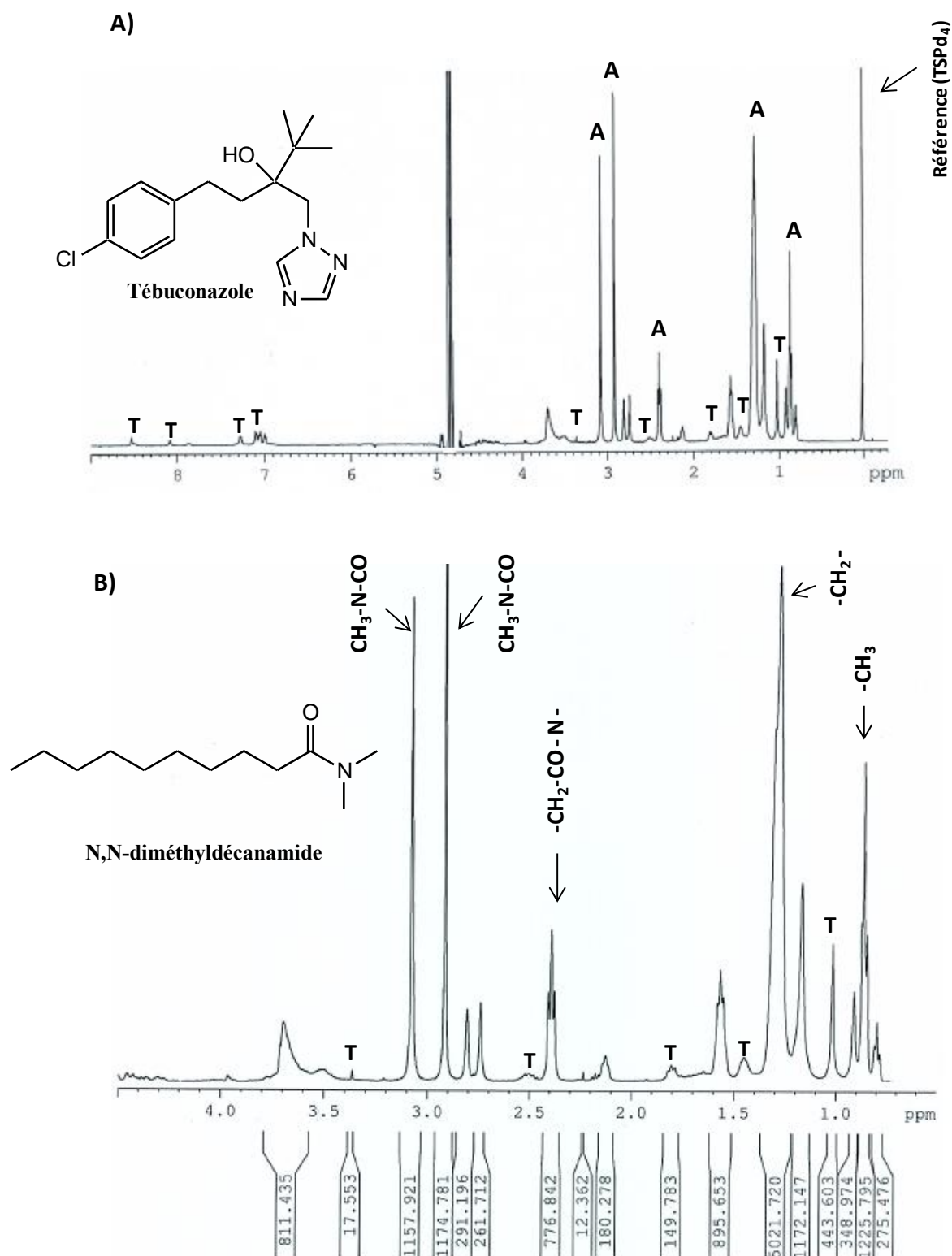


Figure 118 : Spectre RMN ¹H global réalisé dans D₂O du Balmora® contenant 300 µM de tébuconazole. (A) et agrandissement de la zone des aliphatiques (B). T : Tébuconazole, A : N,N-diméthyl-décaneamide

Le spectre RMN ¹H du Balmora® présente de nombreux signaux dont ceux du tébuconazole minoritaire. La région des aliphatiques est particulièrement riche comme nous

pouvions nous y attendre. Les signaux du N,N-diméthyl-décanamide ont pu être attribués par comparaison des déplacements chimiques avec ceux du produit commercial. Le rapport avec le tébuconazole est de 5 à 6 fois, ce qui ne correspond pas aux données de la fiche technique (3 fois au maximum si absence d'autres adjuvants) et semble assez surprenant. Il faut noter la présence de nombreux autres signaux, d'intensité plus faible, qui correspondent aux autres adjuvants inconnus présents dans le mélange.

IV.1. Etude comparative de la biodégradation du tébuconazole pur et formulé (Balmora®) par la souche *Bacillus* sp. 3B6

Dans la première partie des résultats, nous avons montré la capacité de la souche *Bacillus* sp. 3B6 à dégrader partiellement le tébuconazole (10 - 100 μ M) avec un taux de biodégradation de 60-70 % en partant de 200 mL de culture. Dans cette partie, et pour être sûr d'observer des effets sur les mêmes « cellules », nous avons réalisé systématiquement des essais en parallèle, à partir d'une même culture, avec la matière active et la formulation, **en travaillant à concentration identique en matière active**. Nous avons donc testé des concentrations de 25, 50 et 100 μ M en tébuconazole. Les différentes cinétiques de biodégradation du tébuconazole pur et formulé avec *Bacillus* sp. 3B6 sont présentées sur la Figure 119.

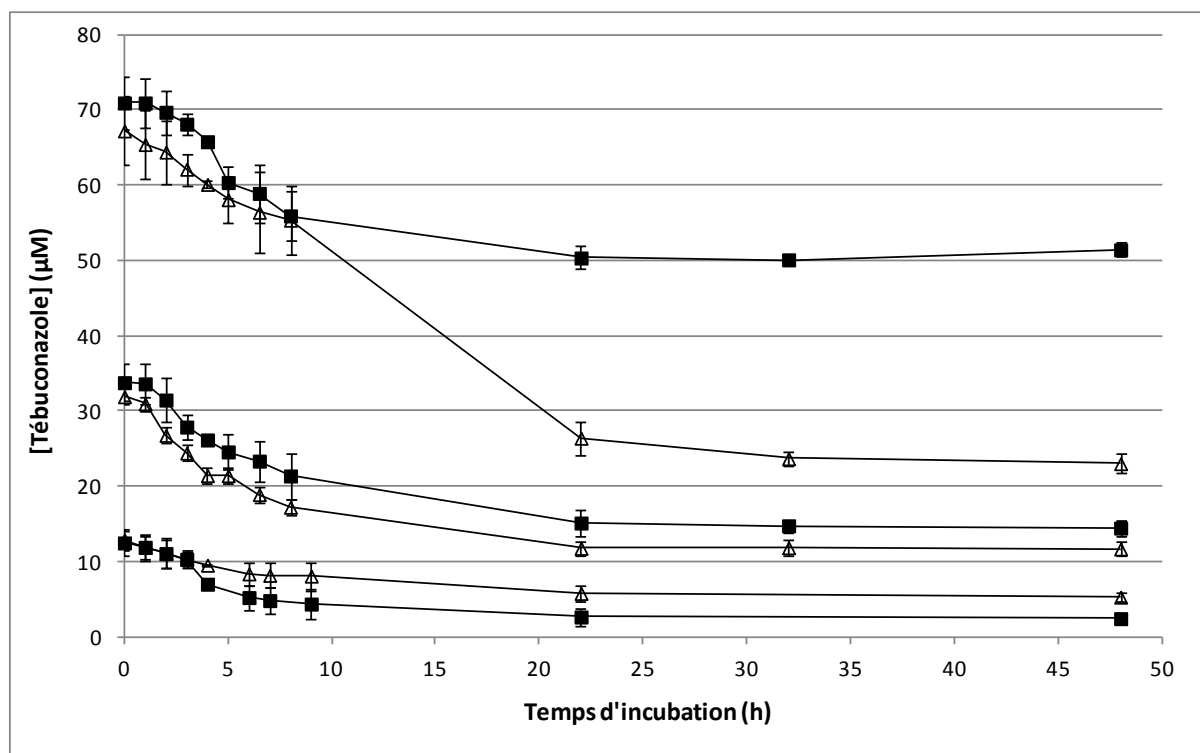


Figure 119 : Cinétiques de biodégradation par *Bacillus* sp. 3B6 du tébuconazole pur ou formulé à différentes concentrations (25, 50 et 100 µM). Tébuconazole (△), Balmora® (■) (3 cultures indépendantes)

Remarque : Les concentrations en tébuconazole à T0 sont celles mesurées dans le surnageant. Elles sont plus faibles que celles théoriques attendues du fait du processus de biosorption mis en évidence dans la première partie. Il faut cependant souligner que la présence des adjuvants de la formulation n'empêche pas ce processus, et même semble le favoriser, contrairement à ce qu'on aurait pu penser, puisque les concentrations initiales de tébuconazole dans le Balmora® sont seulement sensiblement plus élevées que celles de la matière active, la solubilité étant fortement améliorée avec la formulation.

Les interprétations des cinétiques varient en fonction des concentrations en tébuconazole testées. Le fongicide formulé est plus fortement dégradé pour une concentration de 25 µM : 80 % de tébuconazole dissipé contre 56% pour la matière active. Nous pouvons faire l'hypothèse que les adjuvants servent de co-métabolites et favorisent la biodégradation. Pour la concentration intermédiaire (50 µM), un effet légèrement négatif, encore peu significatif, est observé sur le pourcentage de biotransformation, effet qui devient un effet inhibiteur pour une concentration initiale de 100 µM. Il faut noter qu'à cette concentration, la cinétique de dissipation initiale est relativement similaire avec celle de la matière active pure sur les 9 premières heures d'incubation, mais qu'il y a ensuite un arrêt de cette dégradation

dans le cas du fongicide formulé. L'effet n'est donc pas immédiat. Un essai complémentaire, réalisé avec une concentration initiale de 250 μM pour le tébuconazole formulé (cette concentration n'étant pas possible à atteindre avec la matière active seule) a montré une inhibition complète de la biodégradation (Tableau 24).

Tableau 24 : Pourcentage de dissipation du tébuconazole pur ou formulé par la souche *Bacillus* sp. 3B6 à différentes concentrations

Concentration en Tébucanazole	% dissipation (Matière active)	% dissipation (Formulation)
25 μM	56,5 %	79,5 %
50 μM	64,5 %	53,5 %
100 μM	67 %	27,5 %
250 μM	-	0 %

Les adjuvants du Balmora® jouent donc un rôle accélérateur sur la dissipation du tébuconazole avec la souche *Bacillus* sp. 3B6 à la plus faible concentration, sans doute lié à un effet de co-métabolisme, puis un effet inhibiteur à plus fortes concentrations intervenant après quelques heures d'incubation. Nous pouvons faire l'hypothèse de la production d'un métabolite issu d'un adjuvant présentant une toxicité pour cette souche ou d'un effet à long terme d'un des adjuvants. L'absence totale de biodégradation du tébuconazole formulé à 250 μM prouve la présence d'un tel effet qui est croissant suivant la concentration.

Les métabolites formés avec le tébuconazole formulé par la souche *Bacillus* sp. 3B6 sont les mêmes que ceux trouvés auparavant avec la matière active seule. Par contre, leurs concentrations sont dépendantes de la cinétique de dégradation du tébuconazole. Par exemple, pour le tébuconazole 100 μM , les concentrations des métabolites sont plus petites lors de la biodégradation du tébuconazole formulé par rapport à la molécule seule (Figure 120).

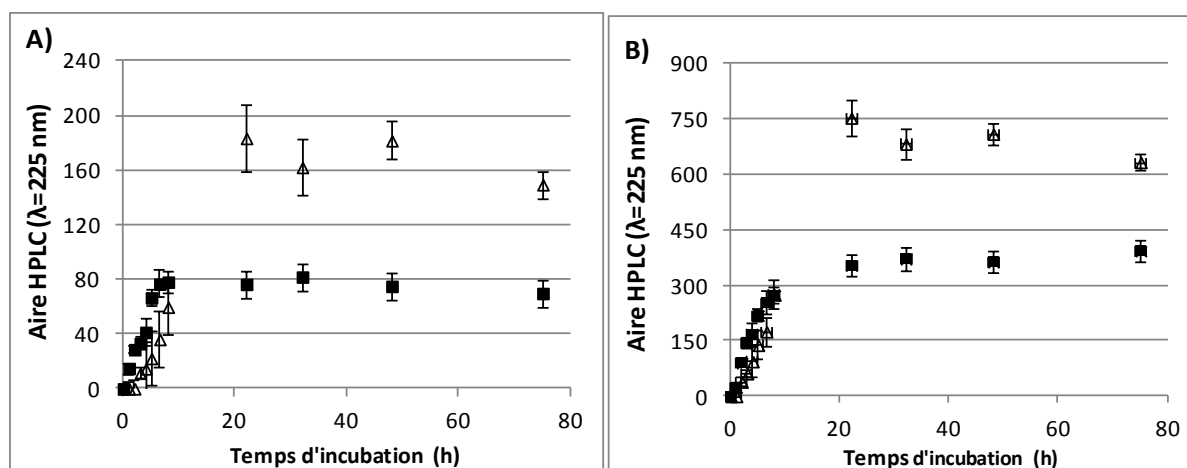


Figure 120 : Cinétiques d'apparitions des métabolites M1 (A) et M2 (B) au cours de la biodégradation du tébuconazole 100 µM seul (Δ) ou formulé (■) par la souche *Bacillus* sp. 3B6 (3 cultures indépendantes)

Nous avons cherché également à suivre le devenir des adjuvants par RMN ^1H afin de mieux comprendre l'effet inhibiteur de la formulation observé. Un suivi des aires des différents signaux principaux correspondant aux adjuvants, en particulier du N,N-diméthyl-décaneamide (Figure 121) a été réalisé durant la biodégradation du Balmora® 100 µM.

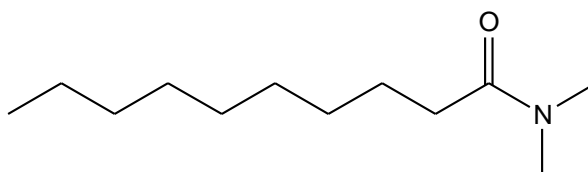


Figure 121 : Structure de N,N-diméthyl-décaneamide

Le suivi montre une diminution progressive de l'ensemble des signaux correspondant aux adjuvants au cours de temps (Figure 122). Entre 0 et 80h d'incubation, plusieurs signaux (massifs centrés sur 0,9 ; 1,15 et 2,3 ppm correspondant aux groupements $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$ et $-\text{CH}_2-\text{CO}-$ de chaînes alkylées) ont totalement disparu. D'autres signaux (singulets à 2,9 et 3,1 ppm correspondant aux deux groupements $-\text{CH}_3$ portés par l'azote de l'amide) ont une aire correspondant au tiers de celle initiale. La dégradation de cet adjuvant commence et est donc plus rapide du côté de la chaîne aliphatique par rapport à la partie amide. Il faut également noter la disparition d'autres signaux correspondant à des adjuvants inconnus. Par exemple, le massif résonnant à 3,7-3,8 ppm disparaît progressivement et complètement au cours du temps (Figure 122). En fin de cinétique, outre les deux singulets attribués aux groupements méthyle portés par un atome d'azote (amide ?), apparaît un grand singulet à 2,7 ppm, qui n'est ni

présent dans le témoin « cellules », ni lors de la biodégradation du tébuconazole seul. Ce signal appartient donc à un métabolite des adjuvants sans qu'on puisse savoir lequel.

A notre connaissance, aucune étude sur le schéma métabolique de biodégradation de N,N-dialkylamide à longue chaîne n'a été publiée. Seules deux études réalisées dans différents types de sol ont montré la grande biodégradabilité du N,N-diméthyl-décanamide avec des temps de dissipation très courts correspondant à 50% et 90% de disparition en 0,5 et 2,5h, et 0,65 et 7,5 jours, respectivement [Flueckiger, 1995 ; Wyss-Benz and Tschegg, 1995]. Les longues chaînes aliphatiques ou d'acides gras sont connues pour être dégradées par une succession de réactions d'oxydation/décarboxylation jusqu'à leur minéralisation ou leur intégration dans le métabolisme central (ω -oxydation). Plusieurs études sur des souches de *Bacillus megaterium* ont mis en évidence ce mécanisme [Willetts, 1974 ; Matson *et al.*, 1977]. Pour le devenir des « amides » dialkylés, il faut plutôt chercher du côté des N,N-diméthylphénylurées (diuron, isoproturon, ...), pour lesquels il a été montré des réactions de N-désalkylation conduisant à des métabolites intermédiaires –N-déméthylés, puis N,N-didéméthylés chez plusieurs souches bactériennes [Sorensen *et al.*, 2001 ; Sun *et al.*, 2009 ; Hussain *et al.*, 2009]. Ce même type de réaction a été montré lors de la biodégradation du N,N-diméthylformamide par un cocktail de souches bactériennes, conduisant à l'apparition de la diméthylamine, avant sa minéralisation totale [Bromley-Challenor *et al.*, 2000].

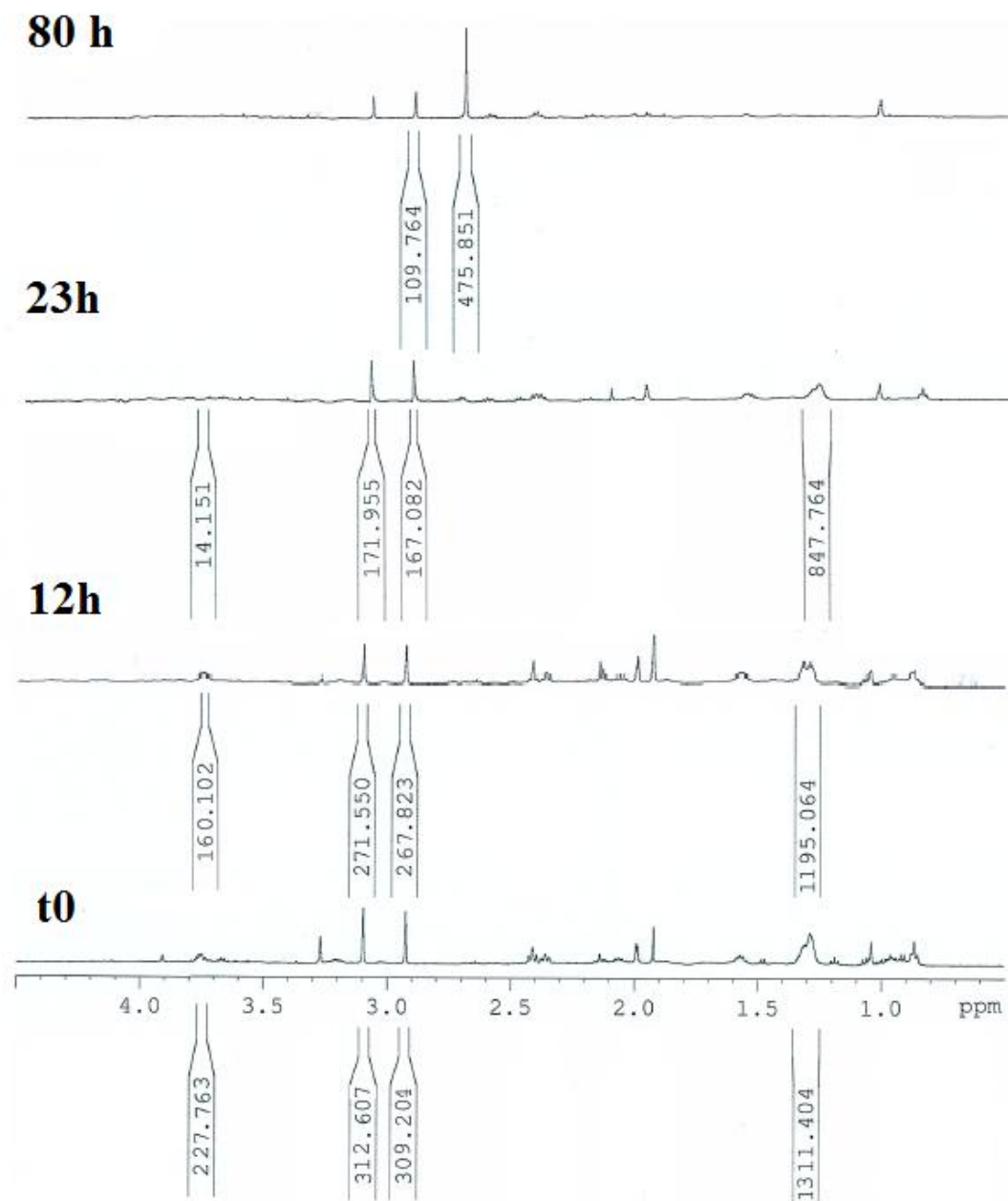


Figure 122 : Suivi par RMN ^1H de la biodégradation des adjuvants du Balmora® 100 μM par la souche *Bacillus* sp. 3B6

Nous pouvons donc comparer, à partir des données de RMN, la cinétique de biodégradation du N,N-diméthyl-décanamide, et du tébuconazole formulé au cours de l'incubation (Figure 123).

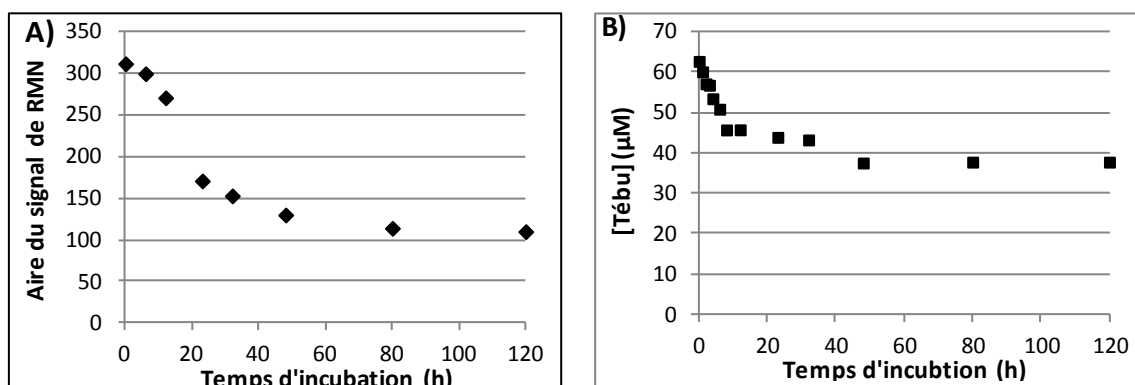


Figure 123 : Suivi (A) de l'aire du signal (3,1 ppm) du N,N-diméthyl-décanamide et (B) de la concentration en tébuconazole formulé (Balmora®) par la souche *Bacillus* sp. 3B6

La dégradation relativement efficace de l'adjuvant a un effet inhibiteur sur celle du tébuconazole par *Bacillus* sp. 3B6. Plusieurs explications peuvent être suggérées : (i) formation d'un métabolite toxique de l'adjuvant qui inhibe la biodégradation du tébuconazole ; (ii) compétitivité pour les substrats disponibles pour un même nombre de microorganismes présents. Il serait également intéressant d'étudier la biodégradation de l'adjuvant seul (N, N-diméthyl-décanamide) pour vérifier si le métabolite donnant un singulet en RMN est issu de cet adjuvant, et de réaliser des tests d'impact de ce composé sur les cellules bactériennes pour vérifier les hypothèses proposées.

IV.2. Etude comparative de la biodégradation du tébuconazole pur et formulé (Balmora®) par la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244

L'effet de la formulation sur la dégradation de la matière active (tébuconazole) est étudié à différentes concentrations. Le tébuconazole seul est mieux dégradé que celui formulé pour toutes les concentrations testées. Pour une concentration de 100 μM, le pourcentage de biodégradation est fortement diminué. Pourtant, même pour une concentration de 250 μM, 22% de dégradation est observée donc nous n'avons pas une inhibition totale de la biodégradation du tébuconazole, contrairement à ce qui a été observé avec *Bacillus* sp. 3B6 (Tableau 25).

Tableau 25: Pourcentage de biodégradation du tébuconazole pur ou formulé par la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244 à différentes concentrations

Concentration en Tébuconazole	% disparition (Matière active)	% disparition (Formulation)
25 μM	50 %	37,5 %
50 μM	55,5 %	49 %
100 μM	48 %	30 %
250 μM	-	22 %

La comparaison des cinétiques de biodégradation du tébuconazole pur et formulé par la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244 (Figure 124) montre l'effet inhibiteur de la formulation. Cet effet est croissant avec la concentration et est vraiment significatif avec la plus forte concentration (100 μM). La phase de latence est observable pour le tébuconazole pur et formulé.

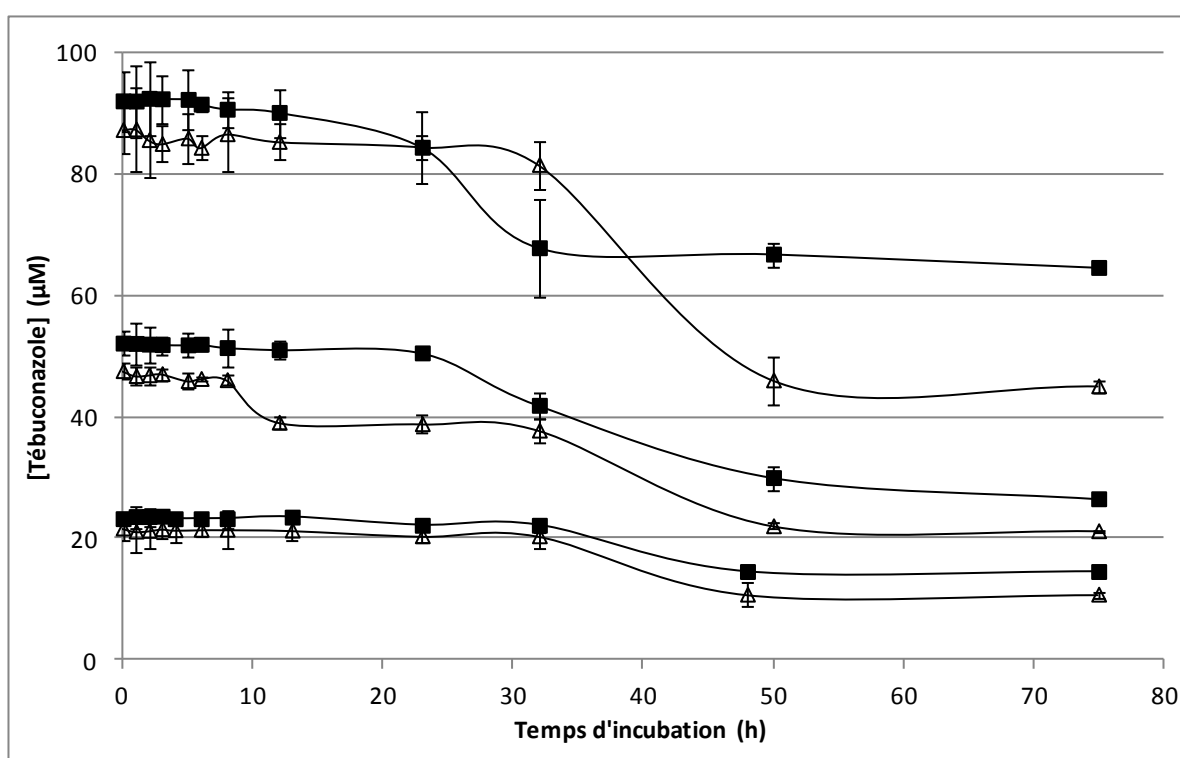


Figure 124 : Influence de la concentration des formulations (25, 50 et 100 μM) sur la biodégradation du tébuconazole pur (Δ) et formulé (\blacksquare) par la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244 (3 cultures indépendantes)

Le devenir des adjuvants avec cette souche n'a pu être suivi par RMN ^1H faute de temps et reste à faire. Comme précédemment, la biodégradation de l'adjuvant connu devra également être envisagée.

V. Conclusion

Par un large criblage de souches, nous avons pu trouver trois souches bactériennes biotransformant partiellement le tébuconazole :

- *Bacillus* sp. 3B6, isolée d'eau de nuages prélevée au sommet du Puy de Dôme, qui biotransforme immédiatement et de manière énantiosélective le tébuconazole jusqu'à 50-60% quelle que soit la concentration initiale et la quantité de cellules, par hydroxylation sur le groupement *tert*-butyle ou sur la chaîne aliphatique, ce dernier subissant ensuite une réaction de déshydratation conduisant à un alcène. Deux de ces métabolites n'avaient jamais été identifiés en tant que métabolites potentiels.

- deux souches de *Pseudomonas* commerciales, *Pseudomonas* sp. C12B ATCC 43648 et *Pseudomonas putida* ATCC 21244, qui biodégradent de manière incomplète le tébuconazole après une longue phase de latence. Aucun métabolite n'a pu être mis en évidence et la minéralisation devra être vérifiée.

Il faut noter que dans la littérature, peu de souches ont été isolées mais qu'elles appartiennent majoritairement au genre *Pseudomonas*. Aucune ne dégrade le tébuconazole totalement, le principal métabolite étant un dérivé hydroxylé sur le groupement *t*-butyle [Sehnem *et al.*, 2010 ; Obanda *et al.*, 2008, 2009].

L'utilisation de la formulation, Balmora®, conduit à un effet neutre ou activateur à faible concentration (co-métabolisme) et inhibiteur croissant avec la concentration, sur la biodégradation du tébuconazole. Il faut noter que la souche Gram négatif (*P. putida*) est moins sensible aux effets de l'adjuvant, pour une même concentration, que la souche Gram positif testée (*Bacillus* sp. 3B6). Nous avons pu également observer que les principaux adjuvants étaient effectivement biodégradés par *Bacillus* sp. 3B6, pouvant conduire à un co-métabolisme positif pour la biodégradation du tébuconazole, mais aussi, à plus fortes concentrations, à une compétition de substrats entre la matière active et les adjuvants ou à la

formation de métabolites plus toxiques que la molécule mère et donc à un effet négatif (effet inhibiteur).

Les adjuvants ont donc un impact en termes de biodégradation des pesticides et il est donc important de travailler sur la formulation (ou les formulations) pour avoir une vision globale du devenir de ces pesticides. La connaissance de l'ensemble des adjuvants contenus dans la formulation (secret industriel !!) pourrait permettre de mieux comprendre l'impact individuel mais aussi les interactions existant entre ces différents composés en termes de biodégradation ou de toxicité.

Impact de la formulation des pesticides, Callisto® et Balmora®, sur la croissance de souches microbiennes

Après avoir montré l'effet inhibiteur des adjuvants présents dans les formulations sur le métabolisme biodégradatif des deux matières actives de pesticides étudiées par plusieurs souches, Gram positif et Gram négatif, dans les chapitres précédents, nous avons voulu étudier un autre aspect de leur potentielle toxicité en suivant l'impact de la formulation sur la croissance de diverses souches bactériennes. Nous avons choisi des souches bactériennes, Gram positif (*Bacillus* sp.) et Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 11303, *Pantoea* sp. 5B12, *Pseudomonas putida* ATCC 21244), dégradant ou non les pesticides, parmi celles testées précédemment. En effet, il est connu que ces deux types de bactéries présentent souvent des sensibilités très différentes vis-à-vis de xénobiotiques organiques et métalliques variés [Trudgill *et al.*, 1971 ; Harrop *et al.*, 1989 ; Suresh *et al.*, 2010]. Nous avons également testé la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 17504) et la levure *Candida albicans* (CIP 444), qui sont classiquement intégrées dans les études de toxicité [Hayyan *et al.*, 2013 et références citées].

Nous avons donc tracé les courbes de croissance de ces différentes souches cultivées sur un milieu relativement pauvre choisi pour limiter la croissance bactérienne, de façon à pouvoir suivre la DO directement dans le tube de culture au cours de l'incubation (milieu PC- cf. Partie Matériels et Méthodes) contenant le pesticide pur ou formulé, à différentes concentrations. Un témoin est réalisé en absence de pesticide pour s'assurer que la souche est bien viable. Les incubations se font dans des tubes bouchés, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les tests de biodégradation (27°C avec une agitation de 200 rpm). La mesure de la croissance bactérienne (DO) est réalisée sur un spectrophotomètre à une $\lambda = 600$ nm. Trois réplicats sont réalisés par conditions et les courbes présentées correspondent aux moyennes. Des comparaisons sont ensuite réalisées entre les courbes obtenues avec la matière

active seule et la matière active + adjuvants (formulation) pour étudier l'impact de ces deux groupes de composés, **pour une même concentration en matière active.**

I. Etude comparative de la croissance de souches bactériennes et de levure en présence de mésotrione pure ou formulée (Callisto®)

La formulation de mésotrione testée est le Callisto®, comme dans les essais précédents de biodégradation. Nous rappelons que pour cette formulation à 100 g/L de matière active, les seuls éléments concernant les adjuvants présents proviennent de sa fiche de sécurité avec la description des additifs potentiellement toxiques, soit l'octan-1-ol à 5-10 % W/W et le « poly(oxy-1,2-éthanediyl), α -isodecyl- ω -hydroxy » (= isodécyl alcool polyéthylène glycol ou PEO 10-6, CAS 61827-42-7), 20-30 % W/W (sachant que la mésotrione représente 9% W :W) [Fiche sécurité Règlement (CE) No. 1907/2006] (Figure 125).

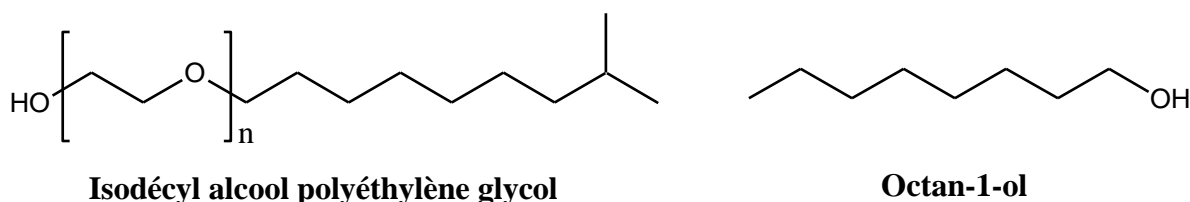


Figure 125 : Structures chimiques des adjuvants connus du Callisto®

I.1. Croissance de souches bactériennes Gram positif

Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux souches de *Bacillus* sp. étudiées précédemment et avons travaillé avec les 3 souches dégradant très rapidement et complètement la mésotrione 1 mM (*Bacillus* sp. 3B6, *Bacillus* sp. IB4 et *Bacillus* sp. IB11) et une souche la dégradant de manière partielle et lentement (*Bacillus* sp. 7B11).

Des concentrations croissantes de mésotrione pure ou formulée (de 0 jusqu'à 1 mM) sont ajoutées en conditions stériles à des cultures bactériennes de *Bacillus* sp. dans le milieu PC. Les croissances de ces souches sont suivies pendant 24 heures.

Des prélèvements (500 μ L) sont réalisés en début et fin d'expérience dans chaque tube pour mesurer le taux de dégradation de la mésotrione dans ces conditions.

I.1.1 Courbes de croissance de *Bacillus* sp. 3B6 en présence de mésotrione pure ou formulée

Les courbes de croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 (Figure 126) montrent une similarité absolue entre absence et présence à différentes concentrations de la mésotrione pure. La matière active (pour des concentrations ≤ 1 mM) n'a aucun effet toxique sur la croissance des cellules bactériennes. On peut remarquer que l'allure des courbes est très spéciale (absence de phase stationnaire conduisant à une forme de cloche) et ceci même en absence de mésotrione. Cette souche a une croissance particulière et caractéristique. Notons que le maximum de croissance des cellules bactériennes est atteint après 7h d'incubation dans ces conditions.

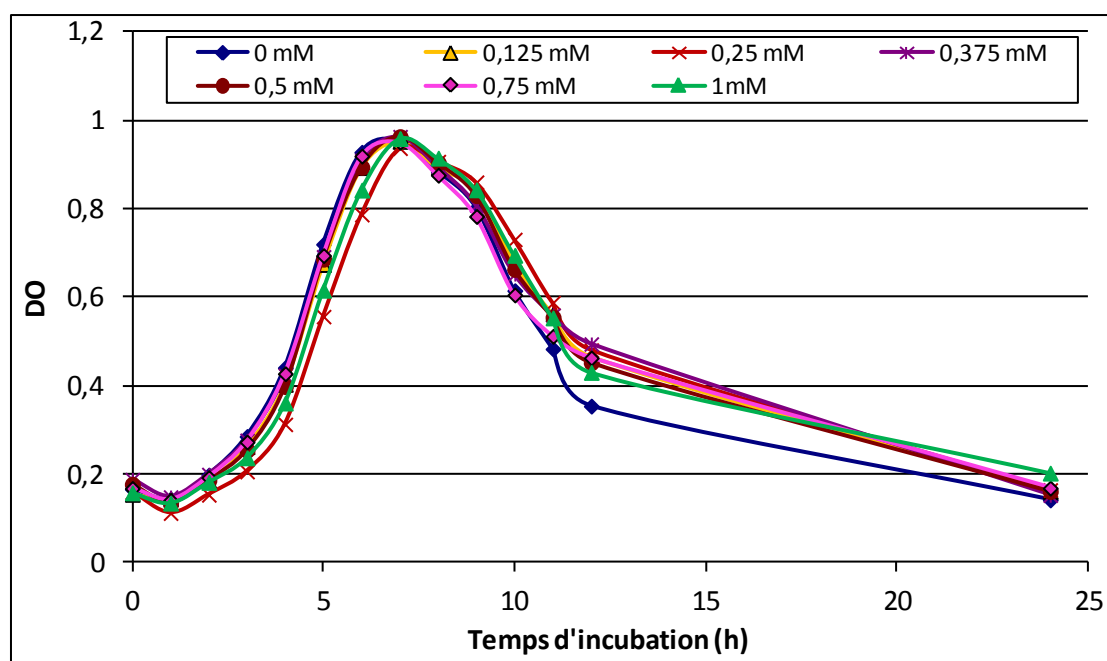


Figure 126 : Courbes de croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de concentrations croissantes de mésotrione pure

Nous avons, en parallèle et sur la même culture, tracé les courbes de croissance en présence des mêmes concentrations croissantes en mésotrione, mais cette fois-ci, formulée

(Callisto®), afin d'observer l'impact/toxicité des adjuvants du Callisto® sur cette croissance. Elles présentent des allures complètement différentes et montrent un très fort effet inhibiteur de la formulation sur la croissance des cellules dès 250 μ M (Figure 127). Aucune croissance bactérienne n'est notée, ce qui confirme la toxicité importante des adjuvants sur les cellules de *Bacillus* sp. 3B6, la matière active n'ayant aucun effet.

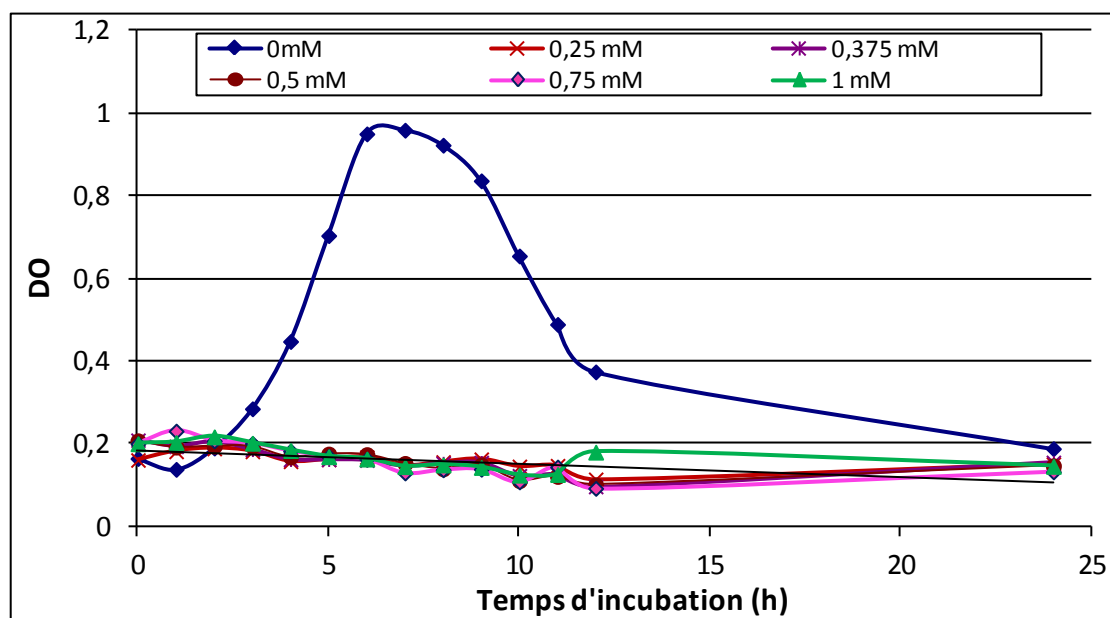


Figure 127 : Courbes de croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de concentrations croissantes de mésotrione formulée (Callisto®)

Nous avons refait une expérience avec cette fois-ci, des concentrations plus faibles en mésotrione formulée afin d'affiner la concentration limite effective: de 25 à 100 μ M. Les courbes de croissance sont présentées sur la Figure 128.

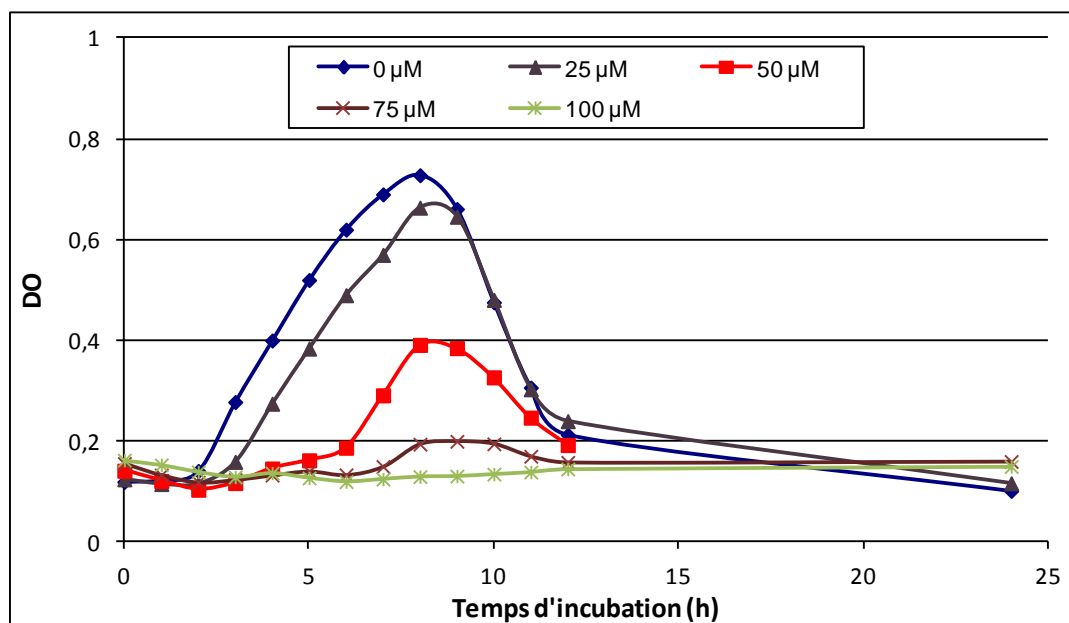


Figure 128 : Courbes de croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de concentrations croissantes de mésotrione formulée (Callisto®)

La toxicité de la mésotrione formulée est bien mise en évidence, même pour des concentrations très faibles. Dès 25 µM, la croissance est légèrement retardée et est moins importante que celle obtenue en absence d'herbicide formulé. Lorsque cette concentration augmente (50 µM), la croissance débute beaucoup plus tard et lentement (3h au lieu de 30 min) et diminue de moitié (DO max de 0,4 au lieu de 0,75 en absence d'herbicide). Enfin, seule une très légère croissance bactérienne est observée (DO max de 0,2) en présence d'une concentration de 75 µM en mésotrione formulée. Ces derniers résultats confirment la très grande toxicité des adjuvants du Callisto® sur la souche *Bacillus* sp. 3B6. Cette toxicité est clairement dépendante de la concentration de la formulation, donc de la concentration en adjuvants.

I.1.2 Courbes de croissance de *Bacillus* sp. IB11 en présence de mésotrione pure ou formulée

Nous avons donc voulu savoir si ce très fort effet toxique des adjuvants de la formulation observé avec *Bacillus* sp. 3B6 étaient également visibles avec d'autres souches de *Bacillus* sp. Les tests de toxicité de la mésotrione seule et formulée sont réalisés sur une autre souche efficace pour la dégradation de la mésotrione : *Bacillus* sp. IB11. Nous avons travaillé avec les mêmes concentrations en matière active que pour *Bacillus* sp. 3B6, en intégrant

cependant une concentration supplémentaire : 50 μ M. Les courbes de croissance obtenues avec la mésotrine pure ou formulée sont présentées sur la Figure 129.

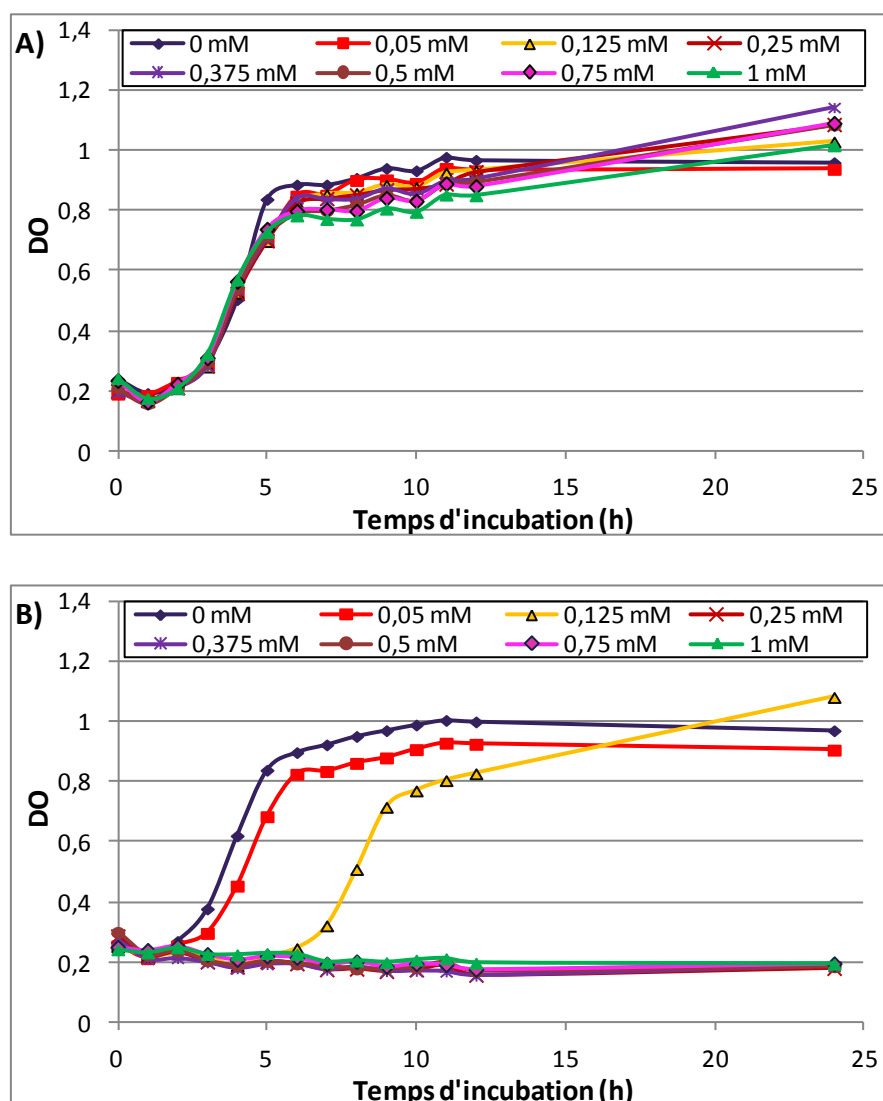


Figure 129 : Courbes de croissance de la souche *Bacillus* sp. IB11 en présence de concentrations croissantes de mésotrine pure (A) et formulée (B)

Les courbes de croissance de *Bacillus* sp. IB11 en présence ou non de mésotrine pure (Figure 129A) suivent la même allure, quelle que soit la concentration. Après 2h de temps de latence, la croissance bactérienne démarre rapidement, puis plus lentement jusqu'à arriver à la phase stationnaire après 12h d'incubation en absence ou en présence d'une faible concentration de mésotrine pure (50 μ M) et 24h pour des concentrations plus fortes. L'allure est classique et très différente de celle observée avec la souche *Bacillus* sp. 3B6. On peut cependant noter une diminution progressive de la DO corrélée à l'augmentation de la concentration en mésotrine entre 5 et 12h d'incubation. Cet effet observable est cependant

minime, la différence étant de 15 % au maximum entre les deux extrêmes de concentrations en mésotrione testées (0 et 1 mM).

En présence de mésotrione formulée (Figure 129B), l'effet inhibiteur sur la croissance de *Bacillus* sp. IB11 est observé dès 50 μ M et il est d'autant plus fort que la concentration en mésotrione formulée est importante, jusqu'à une inhibition complète dès 0,25 mM. Pour 50 et 125 μ M, la phase de latence est augmentée et la croissance maximale est plus faible. Là encore, l'effet toxique de la formulation du Callisto® est mis en évidence et il est largement plus important que l'effet de la matière active seule.

I.1.3 Courbes de croissance de *Bacillus* sp. IB4 en présence de mésotrione pure ou formulée

Nous avons testé la dernière souche dégradant de manière très efficace et rapide la mésotrione : *Bacillus* sp. IB4 avec la mésotrione pure et formulée suivant le même protocole. L'ensemble des courbes de croissance avec cette souche est présenté sur la Figure 130.

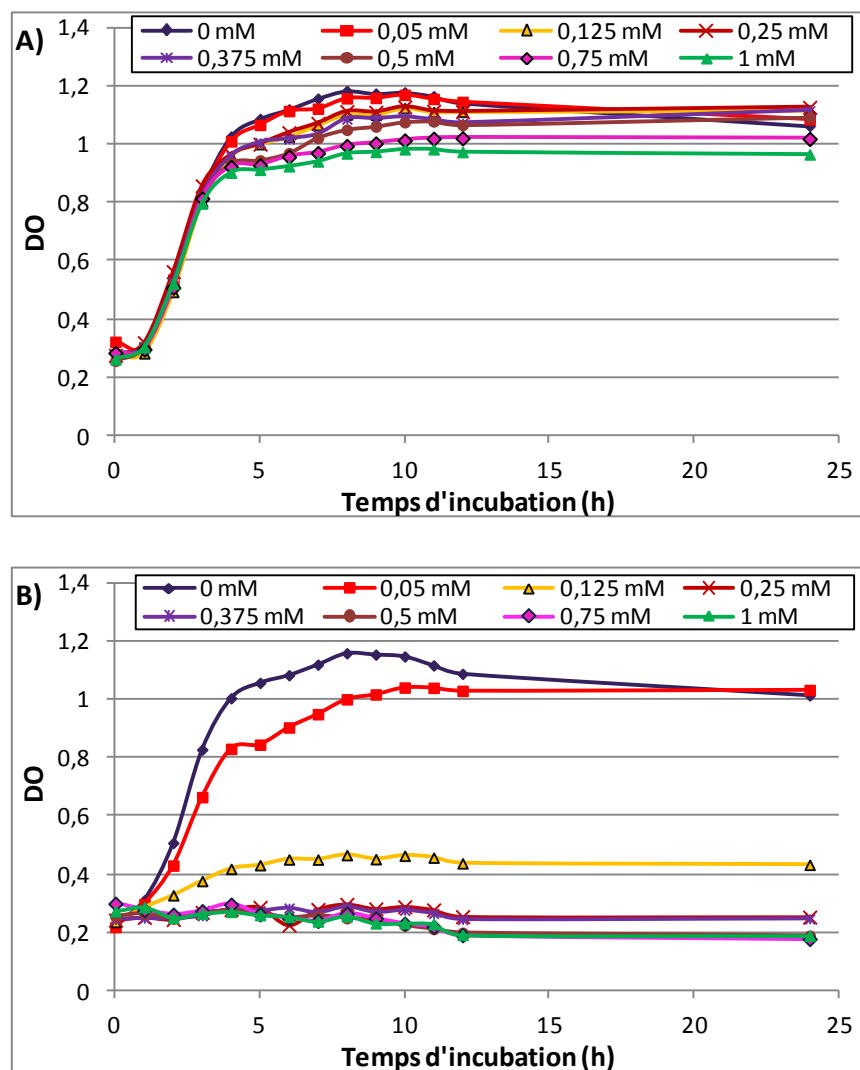


Figure 130 : Courbes de croissance de la souche *Bacillus* sp. IB4 en présence de concentrations croissantes de mésotrione pure (A) et formulée (B)

Les résultats obtenus avec cette souche sont très similaires à ceux observés précédemment : effet minime de la matière active sur la gamme de concentrations testées (Figure 130A) et par contre, un effet toxique d'autant plus important que la concentration en mésotrione formulée est forte (Figure 130B). Comme précédemment, on observe une légère inhibition de la croissance à 50 μ M, qui s'accroît fortement à 125 μ M jusqu'à une inhibition complète à des concentrations supérieures.

I.1.4 Courbes de croissance de *Bacillus* sp. 7B11 en présence de mésotrione pure ou formulée

Une dernière série d'expériences a été réalisée, selon le même protocole, avec une souche de *Bacillus*, qui ne dégrade que partiellement et lentement la mésotrione : *Bacillus* sp. 7B11 (Figure 131).

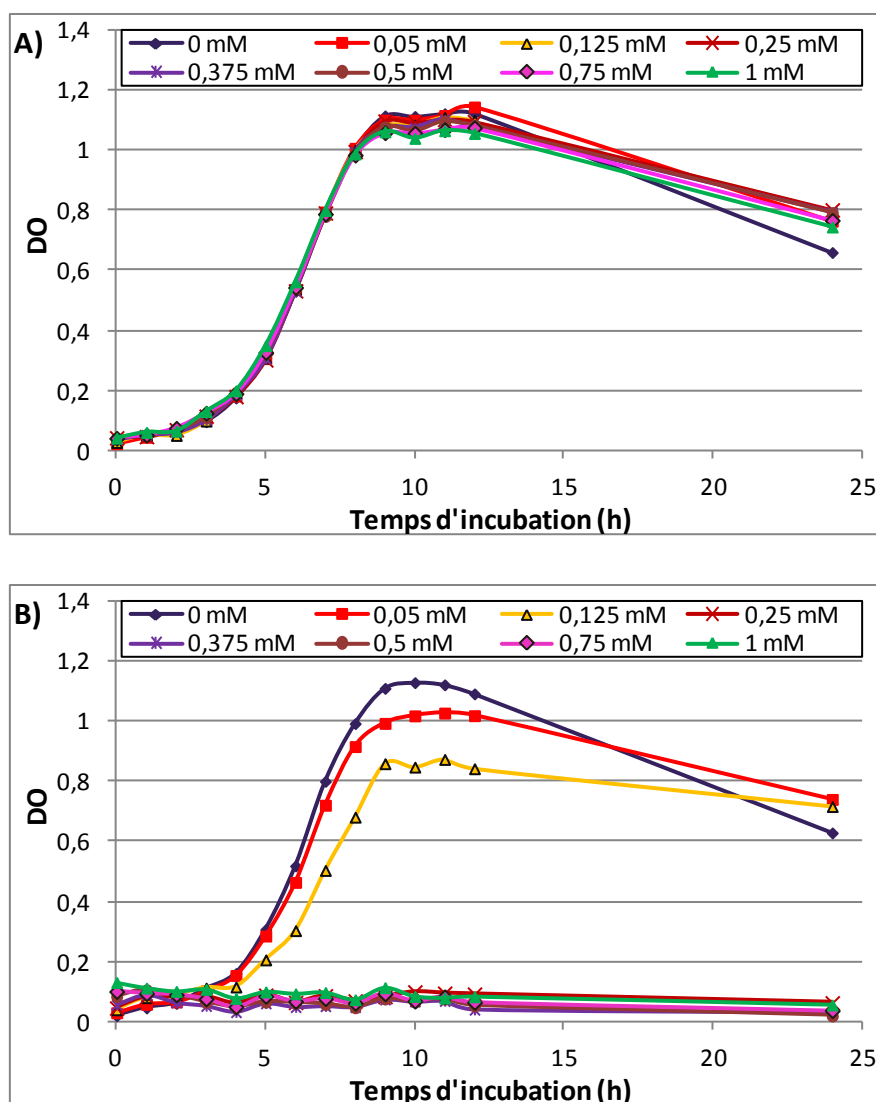


Figure 131 : Courbes de croissance de la souche *Bacillus* sp. 7B11 en présence de concentrations croissantes de mésotrione pure (A) et formulée (B)

Les conclusions sont les mêmes que précédemment : pas d'effet de la matière active quelle que soit sa concentration (Figure 131A), léger effet de la formulation dès une concentration de 50 μ M en matière active, sur la courbe de croissance avec une DO max

diminuée, un effet plus important pour 125 μM et une inhibition totale de la croissance bactérienne pour des concentrations supérieures (Figure 131B).

I.1.5 Conclusions

Avec les quatre souches de *Bacillus* sp. testées, les résultats sont relativement similaires, même si certaines des souches sont plus sensibles : pas ou peu d'effet de la mésotrione pure jusqu'à une concentration de 1 mM (340 mg/L) mais une inhibition totale de la croissance bactérienne en présence de mésotrione formulée (Callisto®) dès 125 μM (42,5 mg/L), mettant en évidence la toxicité des adjuvants du Callisto® sur ces cellules bactériennes Gram positif. Parmi ces souches, *Bacillus* sp. 3B6 est particulièrement sensible puisque l'inhibition de croissance est observée dès 75 μM de mésotrione formulée.

Nous avons, dans tous les cas, vérifié la dégradation effective de la mésotrione dans ces conditions en analysant par HPLC un échantillon prélevé en début et en fin d'expérience (24h d'incubation). La comparaison des taux de dégradation entre la matière pure (P) et formulée (F) de la mésotrione avec chaque souche testée est présentée dans le Tableau 26 :

Tableau 26 : Pourcentage de biodégradation de la mésotrione pure (P) et formulée (F) à différentes concentrations lors de la croissance sur milieu PC de différentes souches de *Bacillus* sp.

	50 μM		125 μM		500 μM	
	P	F	P	F	P	F
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	34 %	9 %	23 %	7,5 %	10 %	2,5 %
<i>Bacillus</i> sp. IB11	-	-	82,5 %	54 %	32 %	0 %
<i>Bacillus</i> sp. IB4	-	-	80 %	36 %	69,5 %	0 %
<i>Bacillus</i> sp. 7B11	68 %	81,6 %	72,5 %	78,5%	63,5 %	0 %

Dans ces conditions, toutes les souches testées dégradent la mésotrione pure avec certes, un taux de dégradation plus faible que lors des études de biodégradation précédentes, ce qui est explicable par la quantité beaucoup moins importante de cellules bactériennes et par la présence d'un milieu nutritif. Le pourcentage de dégradation diminue avec la concentration.

Pour les 3 souches *Bacillus* sp. 3B6, IB4 et IB11, la présence de la formulation inhibe partiellement et même totalement la biodégradation en fonction de la concentration. La seule souche Gram positif qui a un comportement différent est *Bacillus* sp. 7B11. Le taux de dégradation de 70 % est plus important que celui obtenu dans les tests de biodégradation précédents (50 % en « resting cells »). De plus, la présence de la formulation active la dégradation pour les deux concentrations 50 et 125 μM . Cette souche travaille donc en co-métabolisme et la présence d'une autre source de carbone que le pesticide favorise sa croissance et donc la biodégradation de la mésotrione. Il faut atteindre une concentration de 500 μM pour voir une inhibition complète, les adjuvants présentant alors un effet toxique.

I.2. Croissance de souches bactériennes Gram négatif

La question suivante était de savoir si la formulation de la mésotrione avait les mêmes effets sur des bactéries Gram négatif dégradant (*E. coli* ATCC 11303) ou non (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17504) la mésotrione. Le même protocole que celui décrit précédemment, avec la même gamme de concentrations, a été appliqué.

I.2.1 Courbes de croissance d'*Escherichia coli* ATCC 11303 en présence de mésotrione pure ou formulée

Les courbes de croissance d'*E. coli* ATCC 11303, en présence de mésotrione pure ou formulée, sont présentées sur la Figure 132 suivante.

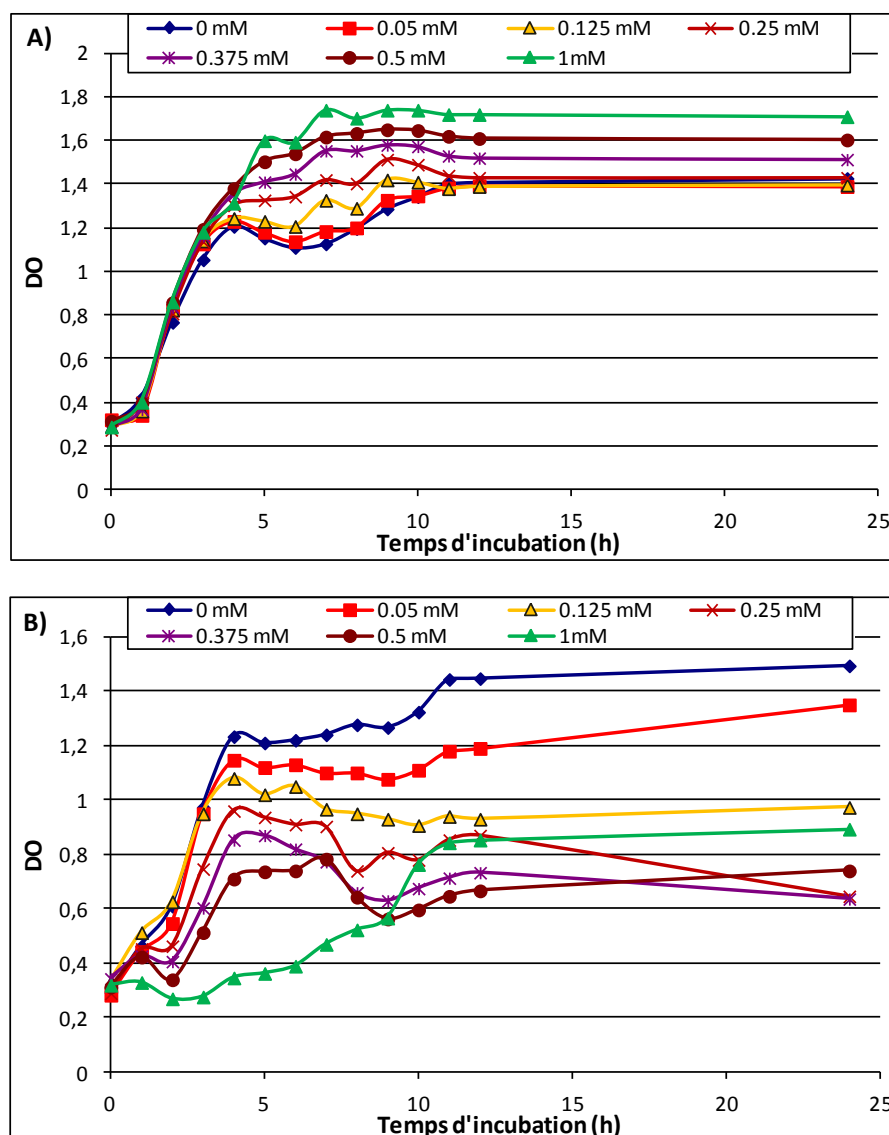


Figure 132 : Courbes de croissance de la souche *Escherichia coli* ATCC 11303 en présence de concentrations croissantes de mésotrine pure (A) et formulée (B)

Avec cette souche, l'addition de concentrations croissantes de mésotrine pure a un effet stimulant significatif sur la croissance des cellules bactériennes, d'autant plus importante que la concentration est forte (Figure 132A). Le maximum de croissance est observé avec la plus grande concentration de mésotrine (1 mM) (DO de 1,7 contre 1,4 en absence de mésotrine). Il semble que cette souche utilise la mésotrine comme source de carbone en même temps que la source de carbone du milieu PC. Notons que la croissance de cette souche est plus forte que celle des souches déjà étudiées.

En présence de mésotrine formulée (Figure 132B), les résultats montrent une toxicité du Callisto® pour les cellules bactériennes, qui augmente avec sa concentration. Cet effet

inhibiteur est cependant beaucoup plus modéré que celui observé avec les souches de *Bacillus* sp. Par exemple, pour une concentration de mésotrione formulée de 0,5 mM, la croissance d'*E. coli* est certes moins rapide, mais aucune croissance n'est observée, même avec une concentration 4 fois plus faible, pour les souches de *Bacillus*. Même pour une concentration de mésotrione formulée de 1 mM, la croissance bactérienne, qui démarre très lentement, atteint une DO de 0,8, ce qui montre la résistance de cette souche vis-à-vis des adjuvants du Callisto®. En résumé, un petit effet inhibiteur est observé, qui augmente progressivement avec la concentration mais n'atteint jamais une inhibition totale de la croissance bactérienne.

I.2.2 Courbes de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17504 en présence de mésotrione pure ou formulée

Nous avons ensuite testé une espèce bactérienne classiquement utilisée dans les tests de toxicité et qui surtout ne dégrade pas la mésotrione. Les courbes de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 17504), en présence de mésotrione pure ou formulée, sont présentées sur la Figure 133.

La matière active seule n'a aucun effet sur la croissance des cellules bactériennes (Figure 133A) et les courbes sont parfaitement superposables, quelle que soit la concentration en mésotrione. Pour la mésotrione formulée, un effet inhibiteur, croissant mais modéré, est observé en augmentant sa concentration (Figure 133B). En effet, même avec une concentration de 1 mM, la croissance est de 70 % par rapport à la référence sans Callisto®.

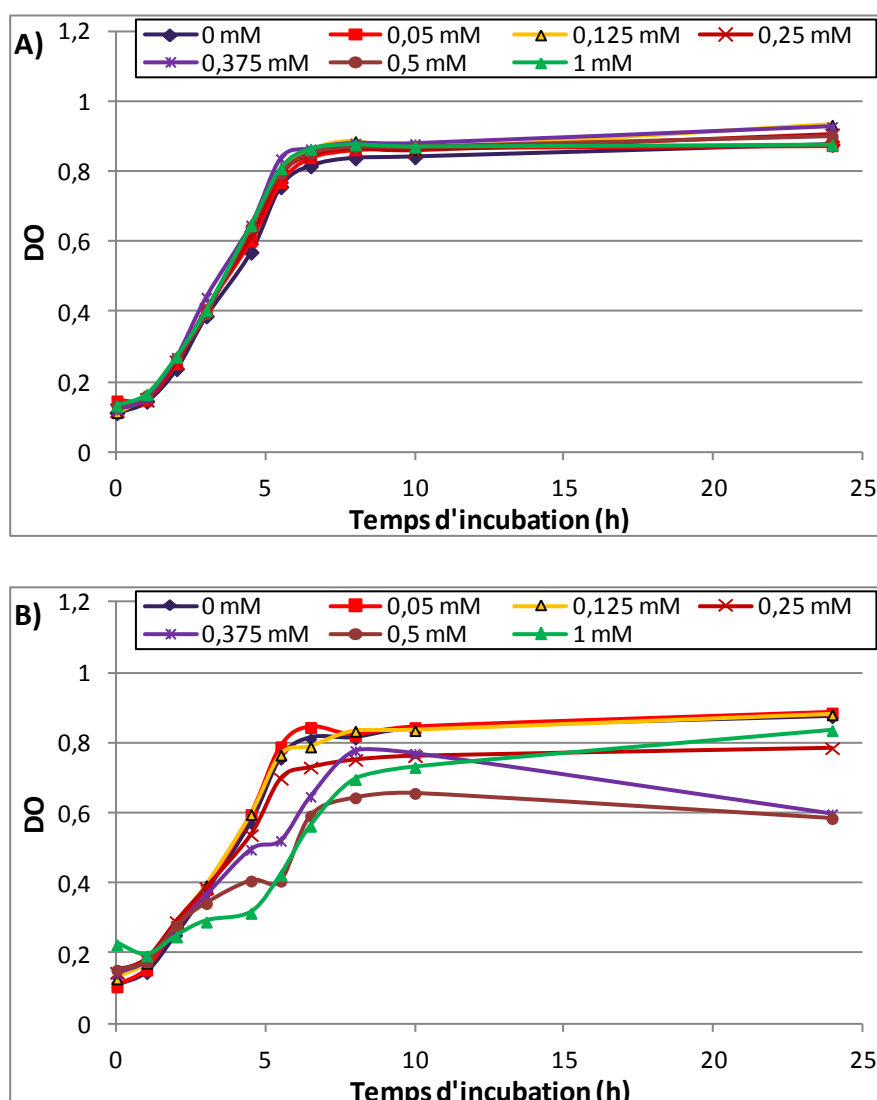


Figure 133 : Courbes de croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17504 en présence de concentrations croissantes de mésotrione pure (A) et formulée (B)

I.2.3 Conclusions

Parmi les souches testées, les souches bactériennes Gram négatif sont beaucoup plus résistantes aux effets potentiellement toxiques des adjuvants présents dans la formulation Callisto  que les Gram positif. Rappelons que la structure de la membrane des souches Gram négatif est plus complexe que celle des souches Gram positif, leur offrant une plus grande résistance aux antibiotiques et aux x nobiologiques. Nos études montrent un comportement similaire vis-à-vis des adjuvants de formulation du Callisto  puisqu'aucun effet inhibiteur

total sur la croissance cellulaire n'est observé même avec une concentration très forte de 1 mM en mésotrione pure ou formulée.

Il faut souligner également l'effet stimulant de la matière active sur la croissance de la souche *Escherichia coli*, qui est la seule souche pour laquelle la mésotrione pure a un impact.

En termes de dissipation, nous avons également analysé un échantillon en début et fin d'expérience. Le Tableau 27 présente les taux de dissipation de la mésotrione à différentes concentrations lors de la croissance dans le milieu PC de ces souches.

Tableau 27 : Pourcentage de dissipation de la mésotrione pure (P) et formulée (F) à différentes concentrations lors de la croissance sur milieu PC de différentes souches Gram négatif

	50 μ M		125 μ M		250 μ M		500 μ M	
	P	F	P	F	P	F	P	F
<i>E. coli</i>	93,6 %	90,5 %	92,5 %	70,2 %	92,4 %	38,7 %	90,5 %	38,3 %
<i>P. aeruginosa</i>	9,1 %	6,3 %	7,1 %	5,9 %	5,3 %	0 %	0 %	0 %

Dans ces conditions, la souche *E. coli* ATCC 11303 montre des capacités de dégradation de la mésotrione pure (et formulée) incroyables (contrairement aux tests de biodégradation en « resting cells », où dans les meilleurs cas, le taux de dégradation observé après 24h d'incubation était de 50%). La mésotrione pure est dégradée à plus de 90 % pour toutes les concentrations testées, même pour 1 mM. La mésotrione formulée est dégradée à 90,5 % pour la plus petite concentration, 50 μ M. Ce pourcentage de dégradation diminue en augmentant la concentration de mésotrione formulée (et donc d'adjuvants) jusqu'à 39 % de dégradation pour une concentration de 500 μ M (et 15 % pour 1 mM). Par conséquent, en termes de dégradation aussi, cette souche présente une plus grande résistance à la toxicité de la mésotrione formulée. La souche *E. coli* ATCC 11303 est plus efficace en présence d'une autre source de carbone (co-métabolisme) qui permet d'augmenter la biomasse bactérienne et d'activer les complexes enzymatiques qui dégradent la mésotrione.

Avec *P. aeruginosa* ATCC 17504, la mésotrione est dissipée faiblement dans ces conditions, le taux de transformation diminuant de 9,1 à 0 % en passant de 50 à 500 μ M. La présence de la formulation inhibe la dissipation pour toutes les concentrations d'autant plus qu'elle est importante.

I.3. Croissance d'une souche de levure, *Candida albicans* CIP 444

Nous avons voulu tester l'impact de la mésotrine pure et formulée sur une cellule eucaryote et avons choisi la levure *Candida albicans* (CIP 444), souvent testée en toxicité. Les tests d'impact de la mésotrine seule ou formulée sur la croissance de cette souche sont réalisés dans les mêmes conditions que précédemment et les courbes de croissance sont présentées sur la Figure 134.

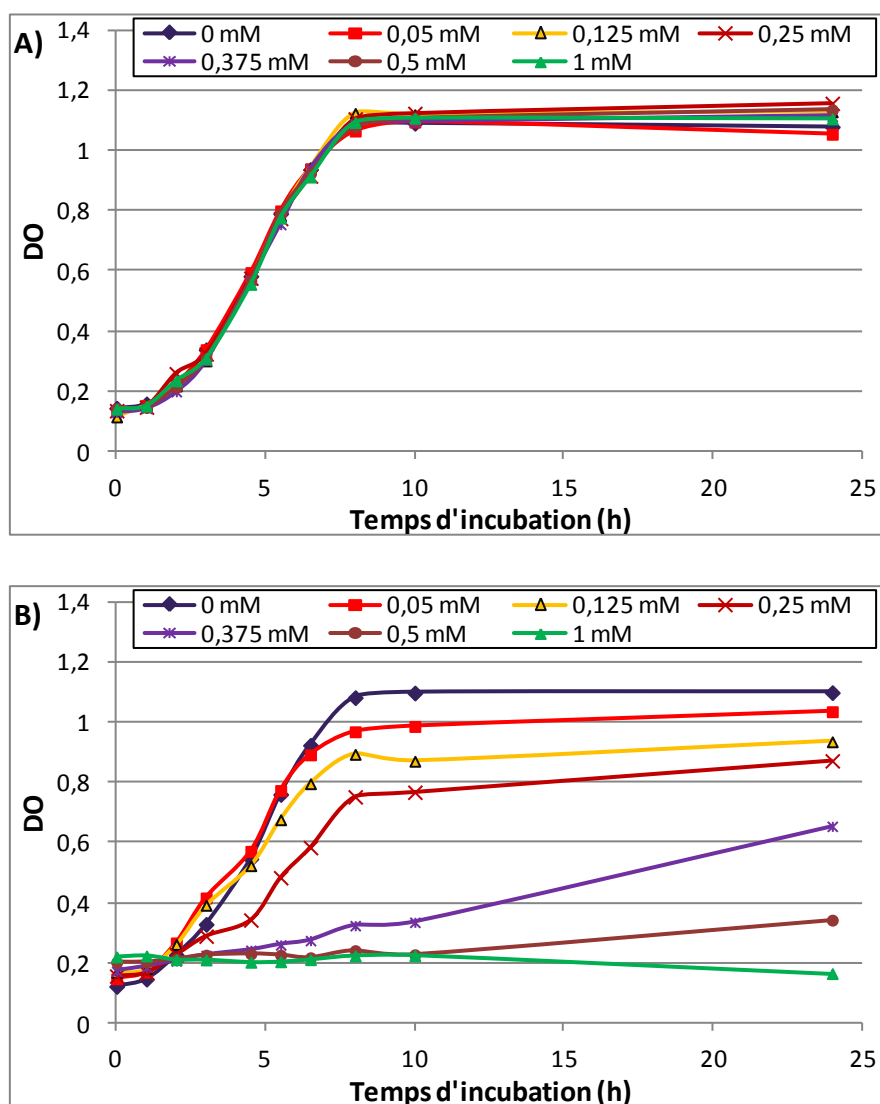


Figure 134 : Courbes de croissance de la souche *Candida albicans* CIP 444 en présence de concentrations croissantes de mésotrine pure (A) et formulée (B)

La matière active est sans aucun effet sur la croissance de cette souche, quelle que soit la concentration (Figure 134A). Par contre, la formulation a bien un impact, allant même

jusqu'à une inhibition complète pour une concentration de 0,5 mM (Figure 134B). Les courbes de croissance montrent une augmentation de l'effet inhibiteur de la formulation corrélée à sa concentration. Cet effet est visible dès 50 μ M ce qui montre une fois de plus l'effet toxique des adjuvants présents dans le Callisto®.

Aucune dissipation de la mésotrione pure ou formulée n'a été observée pendant les 24h d'incubation dans ces conditions et ce, quelle que soit sa concentration initiale.

I.4. Conclusions

Nos études ont permis de mettre en évidence une absence d'effet de la mésotrione pure dans une gamme large de concentrations (de 0 à 1 mM) (à part pour *Escherichia coli*) et un effet inhibiteur sur la croissance de divers microorganismes, bactéries Gram positif et Gram négatif mais aussi levure, de la mésotrione formulée. Cet effet est d'autant plus important que la concentration en formulation, et donc en adjuvants, est forte. Les souches testées se sont révélées plus ou moins sensibles à ces additifs, avec en particulier un fort impact sur les bactéries Gram positif, la croissance étant même totalement inhibée dès la concentration de 125 μ M pour toutes les souches de *Bacillus* sp. Cet effet toxique des adjuvants, en concentration globale beaucoup plus importante que la matière active affecte plus ou moins toutes les souches testées.

Nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature. A notre connaissance, une seule étude de toxicité comparée de la mésotrione pure et formulée (Callisto®) a été publiée [Bonnet *et al.*, 2008]. Ces auteurs ont réalisé des bioessais sur la bactérie luminescente *Vibrio fischeri* en utilisant le test normalisé Microtox® et ils ont montré que la formulation est beaucoup plus toxique avec une $IC_{50} = 1,1$ mg/L (Callisto®) que la matière active pure (43,6 mg/L). De même, dans des études plus environnementales d'impact de la mésotrione pure ou formulée, épandue à 10 fois la dose agronomique, sur les communautés microbiennes du sol [Crouzet *et al.*, 2010 ; Crouzet *et al.*, 2013], seul le Callisto® induit une diminution significative de la biomasse photosynthétique.

II. Etude comparative de la croissance de souches bactériennes en présence de tébuconazole pur ou formulé (Balmora®)

A chaque matière active de pesticide, sa formulation et donc sa composition en adjuvants. Nous avons donc voulu savoir si la formulation du tébuconazole (Balmora®) avait le même impact sur la croissance de ces microorganismes et si on pouvait en tirer des conclusions. Le Balmora® est une des nombreuses formulations du tébuconazole, qui a pour nous l'avantage de ne pas contenir d'autres matières actives. Il contient 250 g/L de tébuconazole et d'après sa fiche de sécurité [Article 31, 1907/2006/CE], du N,N-diméthyl-décanamide à plus de 25 % en volume et d'autres additifs non précisés et considérés comme non toxiques (Figure 135).

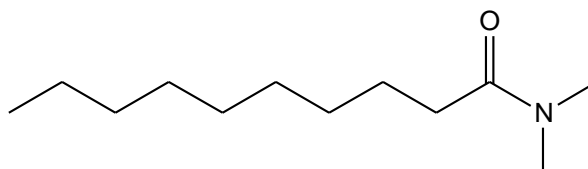


Figure 135 : Structure chimique de l'adjuvant (N,N-diméthyl-décanamide) connu du Balmora®

Nous avons donc étudié l'impact du tébuconazole pur et formulé, à différentes concentrations sur des bactéries Gram positif (deux souches de *Bacillus*, *Bacillus* sp. 3B6 dégradant le tébuconazole et *Bacillus* sp. IB4, ne le dégradant pas) et Gram négatif (2 souches de *Pseudomonas*, là encore l'une dégradant le tébuconazole et l'autre non, et *E. coli* ATCC 11303) et sur la levure *Candida albicans* CIP 444. Le protocole est le même que précédemment, sauf que la gamme des concentrations testée en tébuconazole pur et formulé est plus restreinte, du fait de la limite de solubilité du tébuconazole, soit de 0 à 100 μ M. Notons que les solutions de tébuconazole ont été préparées dans l'éthanol pour être sûr d'avoir une concentration réelle de 100 μ M, le volume d'éthanol ajouté ne dépassant pas 1 % du volume total des cultures bactériennes. Une courbe de croissance de chaque souche en présence de 1 % d'éthanol en volume a été effectuée systématiquement, afin de vérifier qu'il n'y a aucune toxicité due à sa présence seule et une courbe en absence de tout pesticide pour vérifier la viabilité de la souche. Chaque concentration a été testée en triplicat et les résultats présentés correspondent à la moyenne des trois valeurs.

II.1. Croissance de souches bactériennes Gram positif

II.1.1 Courbes de croissance de *Bacillus* sp. 3B6 en présence de tébuconazole pur ou formulé

Les courbes de croissance obtenues avec *Bacillus* sp. 3B6 (Figure 136) montrent une absence de toxicité de l'éthanol ajouté. Le tébuconazole, lui, perturbe la croissance bactérienne, modérément à 50 μM , fortement à 75 μM et complètement à 100 μM .

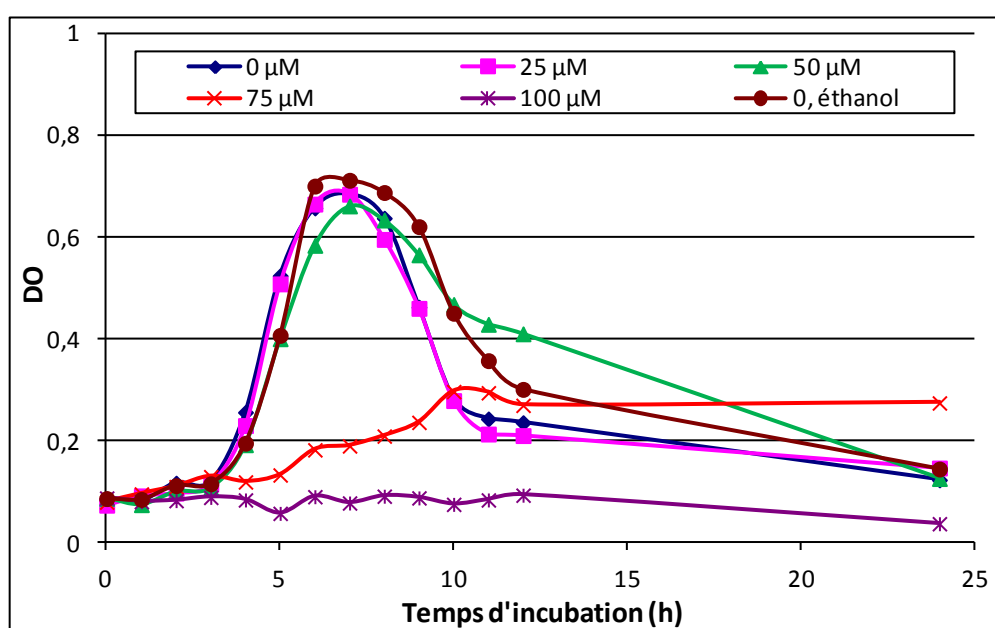


Figure 136 : Croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de concentrations croissantes de tébuconazole pur

Une comparaison est effectuée avec des concentrations similaires en tébuconazole formulé (Balmora®) afin d'étudier la toxicité potentielle due aux adjuvants, qui viendrait ici s'ajouter à celle de la matière active. Les courbes de croissance (Figure 137) montrent que l'effet inhibiteur de la formulation sur la croissance bactérienne est beaucoup plus important que celui de la matière active seule. A partir d'une concentration de 25 μM , une forte inhibition est observée et pour des concentrations plus grandes, il n'y a aucune croissance. Les adjuvants accentuent donc fortement la toxicité du tébuconazole seul.

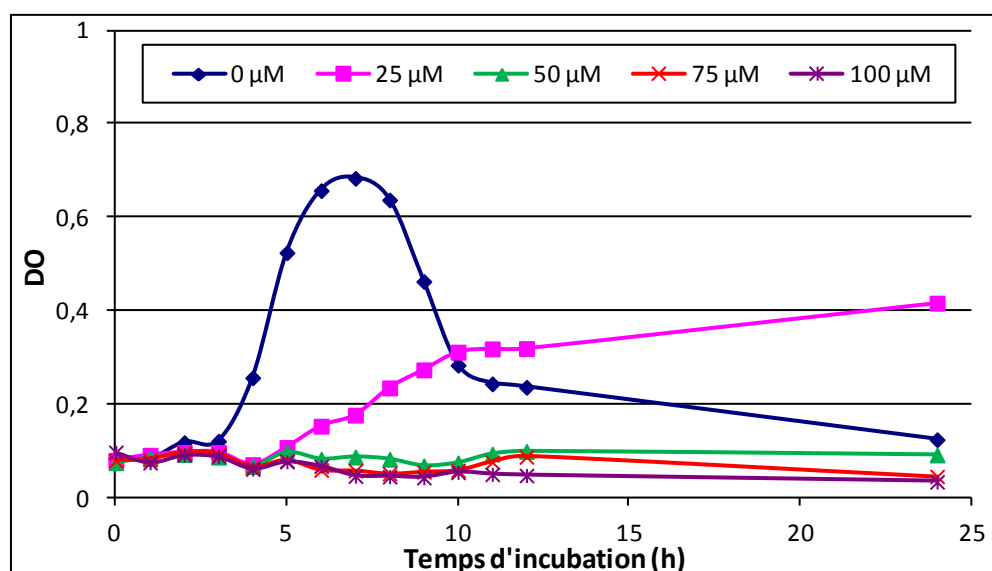


Figure 137 : Croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de concentrations croissantes de tébuconazole formulé (Balmora®)

L'expérience a été répétée avec de plus faibles concentrations en tébuconazole formulé : 10, 20 et 30 μM (Figure 138).

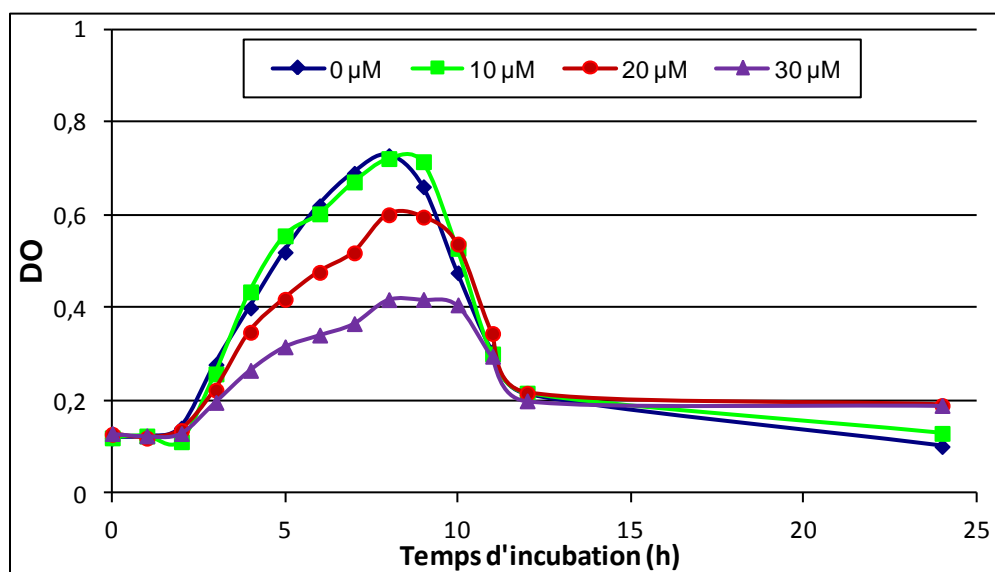


Figure 138 : Croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de concentrations croissantes du tébuconazole formulé (Balmora®)

Dès la concentration de 20 μM en tébuconazole formulé, un léger effet inhibiteur sur la croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 est observé, avec une DO max de 0,6 au lieu de 0,73 en absence de fongicide. L'effet inhibiteur augmente pour la concentration 30 μM. Cette

souche se révèle à nouveau très sensible, non seulement à la matière active mais également aux adjuvants de la formulation.

Le taux de biodégradation du tébuconazole pur et formulé a été mesuré par analyses HPLC de prélèvements (500 μ L) réalisés en début et fin d'incubation dans chaque tube (Tableau 28).

Tableau 28 : Pourcentage de biodégradation du tébuconazole pur (P) et formulé (F) à différentes concentrations lors de la croissance sur milieu PC de la souche *Bacillus* sp. 3B6

	25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M	
	P	F	P	F	P	F	P	F
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	23,5 %	6,6 %	14,8 %	3,4 %	14,5 %	3 %	0 %	0 %

Le taux de biodégradation du tébuconazole pur est faible dans ces conditions mais existe jusqu'à une concentration de 75 μ M. Le tébuconazole formulé lui est très peu dégradé.

II.1.2 Courbes de croissance de *Bacillus* sp. IB4 en présence de tébuconazole pur ou formulé

Cette deuxième souche de *Bacillus* testée ne dissipe pas le tébuconazole, ce qui a été vérifié dans ces conditions. Les courbes de croissance de *Bacillus* sp. IB4 en présence de tébuconazole pur ou formulé sont présentées sur la Figure 139.

Si l'addition d'éthanol à 1% n'a aucun effet sur la courbe de croissance, la présence du tébuconazole pur (Figure 139A) montre une sensibilité croissante de la souche en fonction de sa concentration. A partir d'une concentration de 50 μ M, une inhibition de la croissance bactérienne est observée allant jusqu'à un taux de plus de 50 % pour une concentration de 100 μ M.

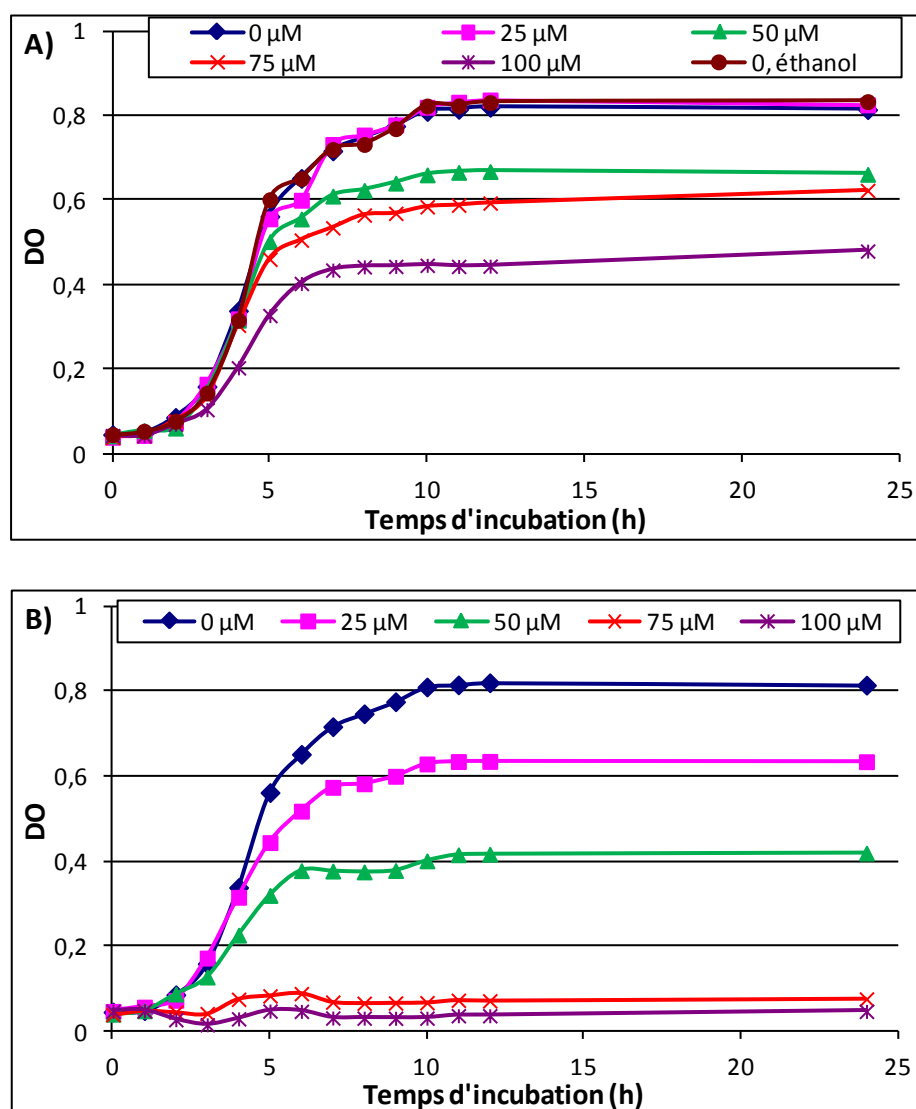


Figure 139 : Croissance de la souche *Bacillus* sp. IB4 en présence de concentrations croissantes de tébuconazole pur (A) ou formulé (B)

La matière active formulée est beaucoup plus toxique pour la souche *Bacillus* sp. IB4 comme le montrent les courbes de croissance de la Figure 139B. Un effet inhibiteur est observé dès la concentration de 25 μ M allant jusqu'à une absence complète de croissance pour une concentration de 75 μ M. L'effet de la formulation est donc beaucoup plus important que celui de la matière active seule.

II.1.3 Conclusions

Les résultats obtenus avec ces deux souches de *Bacillus* sont relativement similaires : un effet inhibiteur de la matière active sur la croissance bactérienne de modéré à fort, ce qui n'avait pas été observé pour la mésotrione. La souche *Bacillus* sp. 3B6 se révèle une nouvelle

fois beaucoup plus sensible que *Bacillus* sp. IB4. En tant que fongicide, le tébuconazole agit en inhibant la synthèse de l'ergostérol, qui est un élément essentiel de la membrane fongique, non présent chez les bactéries. Il semble cependant présenter également une activité antibactérienne, qui suggère une autre cible. Kumar *et al.* [2010] ont montré le même effet sur la croissance (mais aussi sur des fonctions métaboliques et enzymatiques) d'une cyanobactérie *Westiellopsis prolifica*, mais ils ont travaillé avec la formulation. Dans notre travail, cet effet inhibiteur est exacerbé en présence de la formulation, avec un impact négatif sur la croissance de *Bacillus* sp. 3B6 dès 50 μ M. Deux hypothèses peuvent être envisagées :

- 1- les adjuvants du Balmora® (ou du moins certains) sont toxiques pour les souches de *Bacillus* ;
- 2- les adjuvants permettent à la matière active de pénétrer plus facilement à l'intérieur des cellules bactériennes et accentuent l'impact de la matière active.

II.2. Croissance de souches bactériennes Gram négatif

II.2.1 Courbes de croissance de *Pseudomonas putida* ATCC 21244 en présence de tébuconazole pur ou formulé

Avec cette souche, qui dégrade très peu le tébuconazole dans ces conditions (3%) pour toutes les concentrations testées (25-100 μ M), l'effet de la matière active seule jusqu'à 100 μ M est négligeable (Figure 140A) malgré une très légère diminution du maximum de croissance par rapport au témoin. Cette inhibition très minime pourrait en partie, provenir de la présence d'éthanol. Les tests sont repris avec la matière active formulée (Figure 140B). Les courbes de croissance de *Pseudomonas putida* correspondantes montrent un effet inhibiteur modéré, seulement à partir d'une concentration de 100 μ M. Pour des concentrations plus faibles, aucun effet n'est noté.

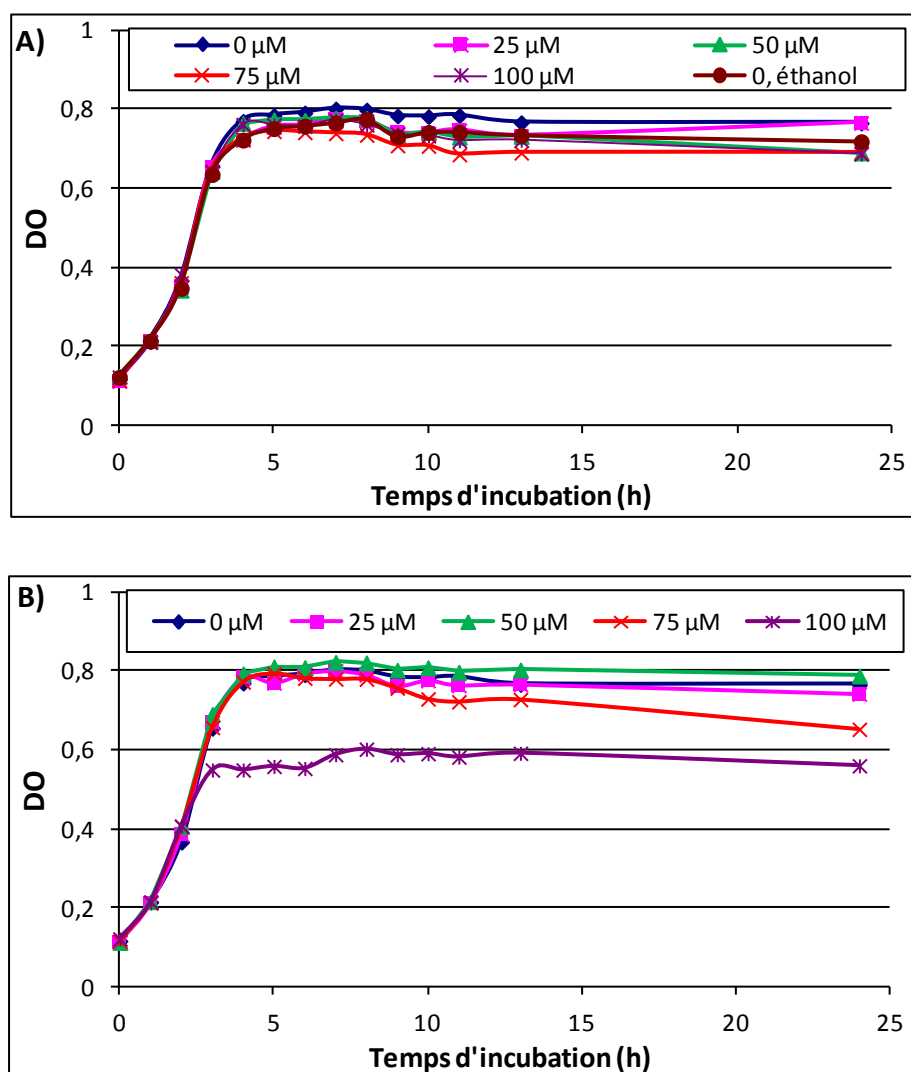


Figure 140 : Croissance de la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244 en présence de concentrations croissantes de tébuconazole pur (A) ou formulé (B)

Contrairement à l'effet très marqué qui était observé avec la souche *Bacillus* sp. 3B6, *Pseudomonas putida* ATCC 21244 ne semble pas vraiment sensible aux adjuvants de la formulation Balmora®.

II.2.2 Courbes de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17504 en présence de tébuconazole pur ou formulé

Nous avons voulu tester une autre souche de ce genre pour vérifier si cette absence d'effet était généralisable, en utilisant *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17504. Pour cette souche, au vue des résultats précédents, seules les fortes concentrations ont été testées. Les

courbes de croissance en présence de tébuconazole pur et formulé sont présentées sur la Figure 141.

Cette souche est relativement insensible à la matière active seule dans toute sa gamme de solubilité (Figure 141A). Un léger décrochement est observé pour la concentration maximale de 100 μM . De même, aucun effet sur la croissance n'est observé pour des concentrations inférieures à 75 μM (données non montrées) en tébuconazole formulé (Figure 141B). Il faut atteindre une concentration de 100 μM pour observer une inhibition de croissance de 60% environ. Cette inhibition est renforcée lorsque nous sommes en présence de 250 μM de formulation (Figure 141B).

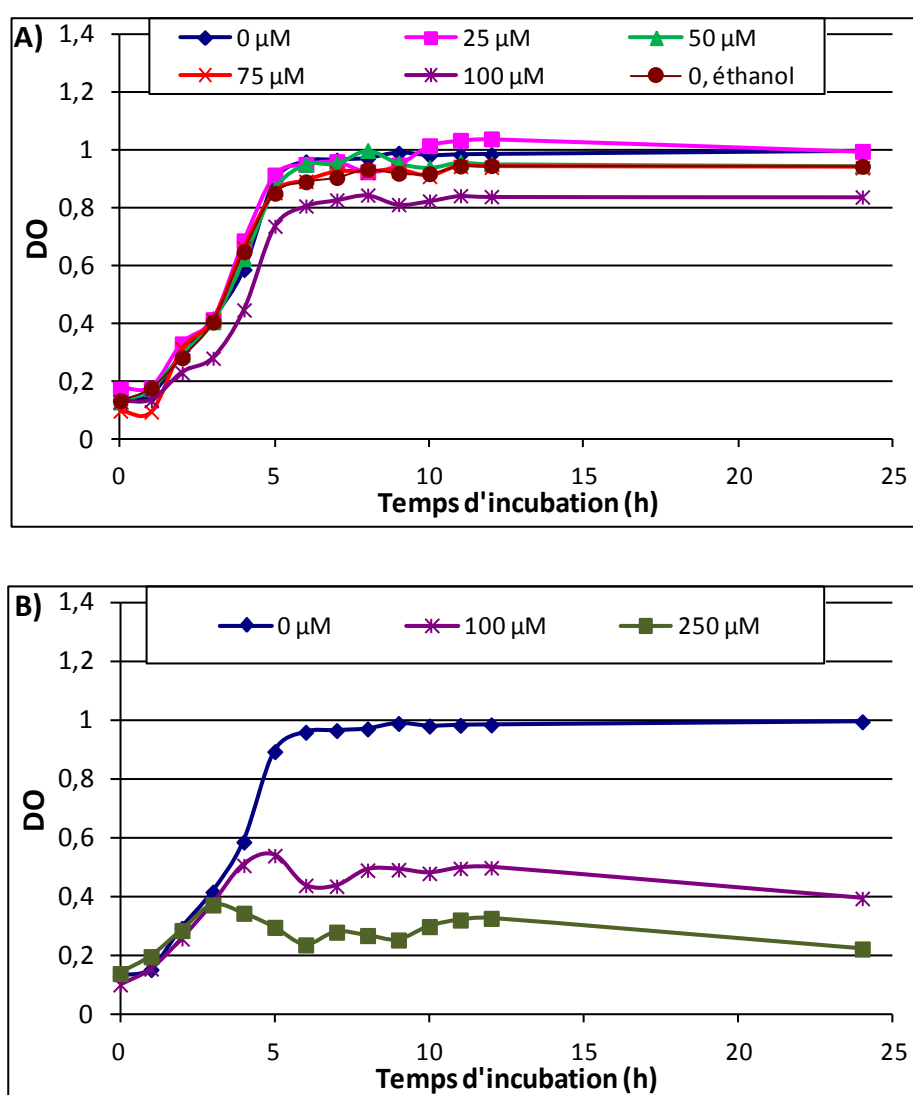


Figure 141 : Croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 17504 en présence de concentrations croissantes de tébuconazole pur (A) ou formulé (B)

II.2.3 Courbes de croissance d'*Escherichia coli* ATCC 11303 en présence de tébuconazole pur ou formulé

Dans la première partie, la souche *E. coli* ATCC 11303 s'est montrée positivement affectée par la mésotrione pure et sensible vis-à-vis de la mésotrione formulée sous forme de Callisto®. Nous avons donc réalisé des essais de croissance en présence de tébuconazole pur et formulé, fongicide qu'elle ne dégrade pas, dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites.

Un effet inhibiteur significatif de l'éthanol à 1% sur la croissance bactérienne est observé, qui laisse supposer une absence d'effet de la matière active. Le décalage observé dans les courbes de croissance en fonction de la concentration en matière active semble en fait lié au taux d'éthanol ajouté (Figure 142A). De même, pour le tébuconazole formulé, aucun effet sur la croissance bactérienne n'est observé dans cette même gamme de concentrations (Figure 142B). Nous avons donc testé une concentration plus importante de tébuconazole formulé et avons noté une inhibition d'environ 50% pour une concentration de 250 µM. Rappelons que nous ne pouvons pas comparer avec l'équivalent en matière active seule en raison de la faible solubilité du tébuconazole dans l'eau.

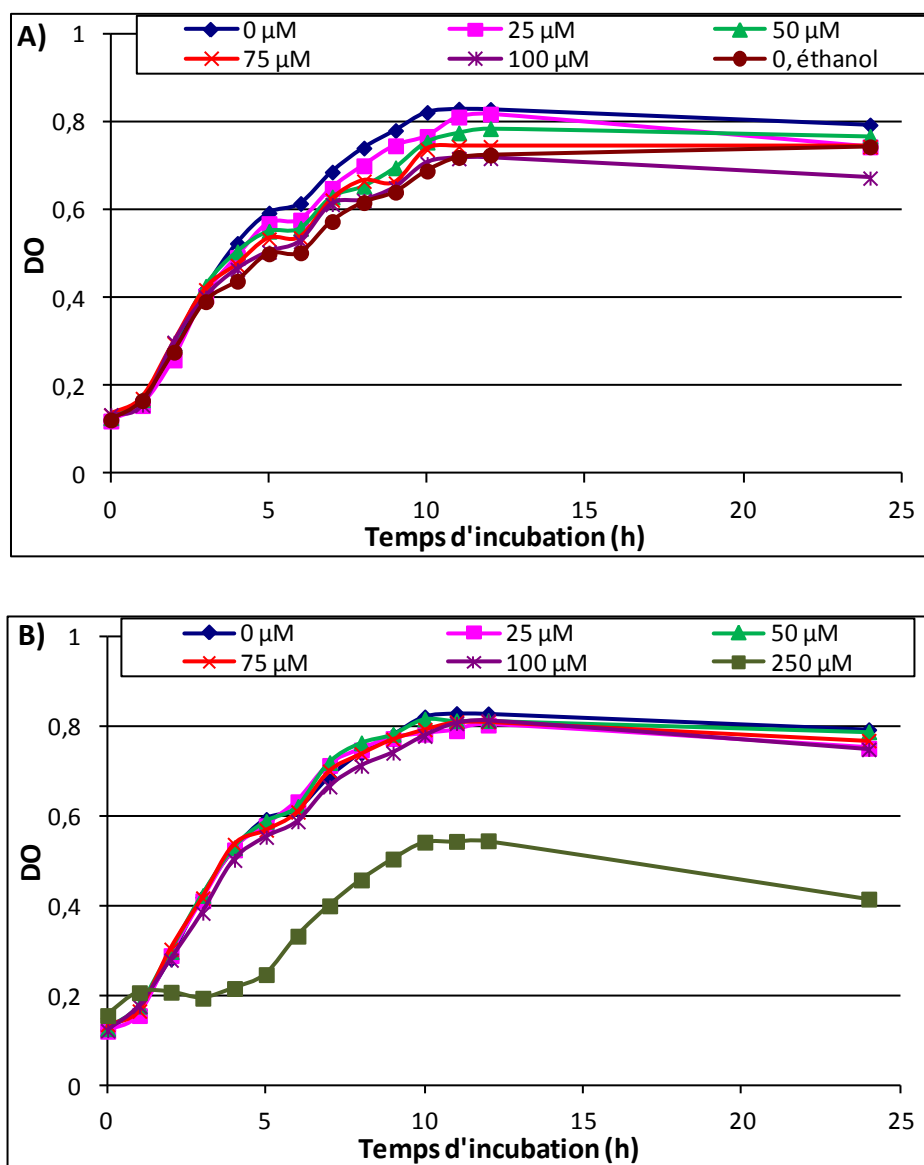


Figure 142 : Croissance de la souche *Escherichia coli* ATCC 11303 en présence de concentrations croissantes de tébuconazole pur (A) ou formulé (B)

II.2.4 Conclusions

Les résultats obtenus avec ces trois souches Gram négatif montrent une absence complète d'effet de la matière active tébuconazole et un effet visible uniquement à fortes concentrations (100 voire 250 μM) du tébuconazole formulé sur leur croissance dans nos conditions. Elles semblent beaucoup moins affectées par les adjuvants que les souches Gram positif testées.

Les deux souches testées, *E. coli* ATCC 11303 et *P. aeruginosa* ATCC 17504, ne dégradent pas le tébuconazole dans ces conditions. La souche *P. putida* ATCC 21244 qui, dans les tests de biodégradation, a biotransformé le tébuconazole à des concentrations inférieures à 100 μM avec un pourcentage de 50-70 %, dégrade seulement 3 % du tébuconazole dans ces conditions, pour toutes les concentrations, le fongicide étant sous forme pure ou formulée.

II.3. Croissance d'une souche de levure, *Candida albicans* CIP 444

Nous avons donc voulu tester la réponse d'un microorganisme eucaryote, *Candida albicans* CIP 444 vis-à-vis du tébuconazole pur ou formulé. La particularité cette fois est que le tébuconazole étant un fongicide, il peut avoir un effet antifongique contre cette souche. Par contre, il est important d'étudier la modulation de cet effet par rapport à la formulation.

Les courbes de croissance montrent clairement l'effet fongicide du tébuconazole sur les cellules de *Candida albicans* (Figure 143A). L'effet est logiquement croissant avec la concentration de tébuconazole mais n'est pas total, même avec une concentration de 100 μM . Cette souche, contrairement à ce qui était attendu, est cependant moins sensible que les bactéries Gram positif testées. Notons aussi que l'éthanol a un effet significatif sur la croissance fongique pendant les 10 premières heures d'incubation, la DO max étant inférieure de 30%, ce qui est plus inattendu.

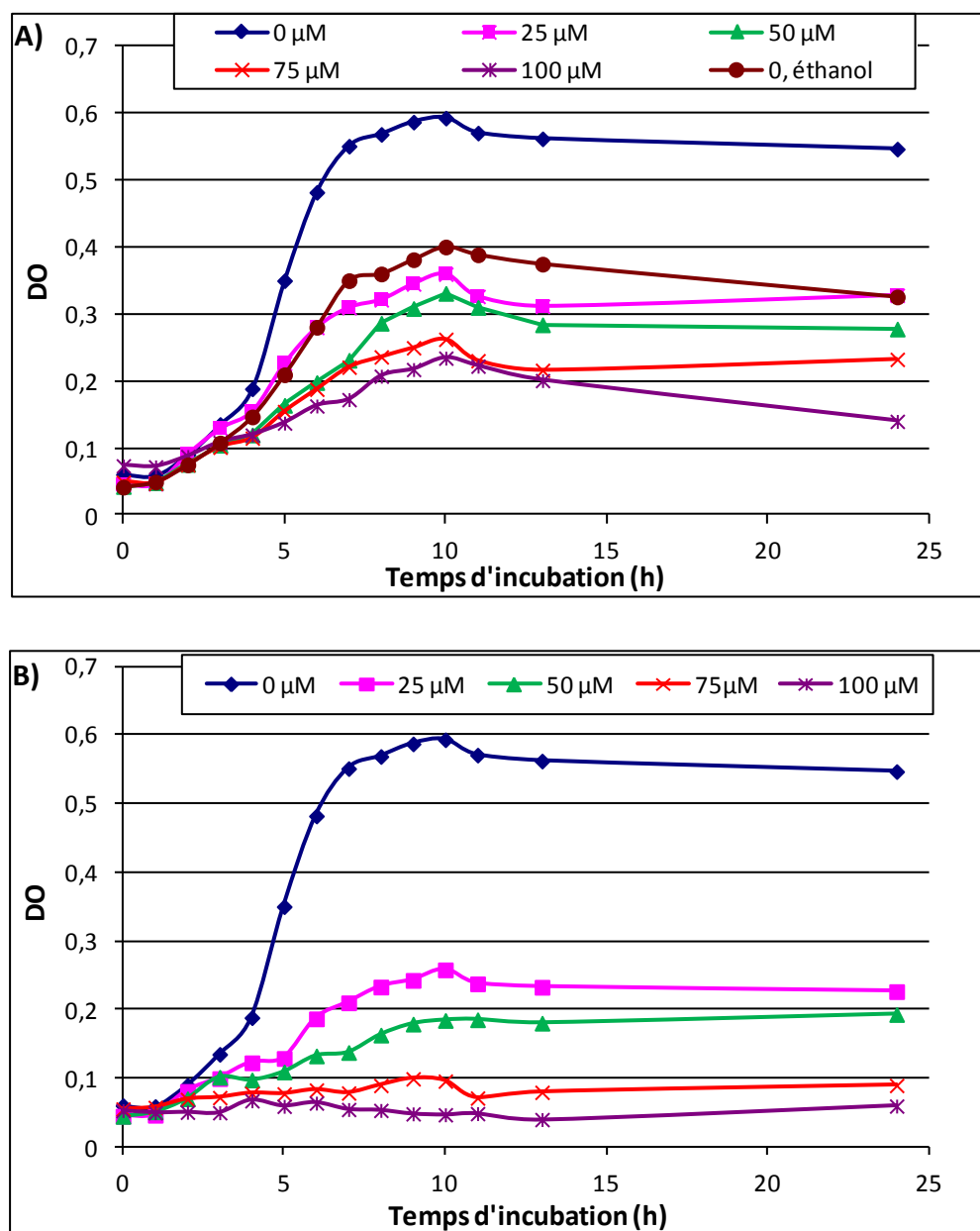


Figure 143 : Croissance de la souche *Candida albicans* CIP 444 en présence de concentrations croissantes de tébuconazole pur (A) ou formulé (B)

En présence du Balmora®, l'effet inhibiteur sur la croissance de cette souche est beaucoup plus important (Figure 143B), avec même une inhibition totale dès 75 μM . Les adjuvants viennent cette fois accentuer l'effet de la matière active sur ces cellules, soit en améliorant la pénétration de la matière active dans les cellules fongiques, soit en ayant un effet synergique toxique pour ces cellules.

II.4. Conclusions

Nos études ont permis de mettre en évidence un effet inhibiteur significatif du tébuconazole pur sur la croissance des souches bactériennes Gram positif et la levure testées, qui est fortement exacerbé en présence des adjuvants de la formulation. Les bactéries Gram négatif testées, elles, se révèlent insensibles au tébuconazole pur ou formulé pour leur croissance. Il faut vraiment une concentration très forte en Balmora® (250 µM) pour commencer à observer un effet inhibiteur.

A notre connaissance, aucune étude comparant l'impact de la matière active et d'une formulation de tébuconazole n'a été publiée. Nous pouvons juste nous référer à des travaux sur l'une ou l'autre forme du fongicide. Par exemple, Ahemad et Saghir Khan [2012a et b] ont comparé l'impact de plusieurs fongicides purs à différentes concentrations (de la dose agronomique 100 µg/L à trois fois la dose), notamment sur le potentiel de solubilisation du phosphate de deux rhizobactéries, *Klebsiella* sp. et *Pseudomonas putida* (Gram négatif). Le tébuconazole est le plus impactant avec une diminution de cette activité de plus de 6 et 3 fois respectivement, pour une concentration de 100 µM. Kumar *et al.* [2010], eux, ont montré la toxicité de la formulation Folicur® (25,9 % de tébuconazole) sur la croissance de la cyanobactérie *Westiellopsis prolifica* dès une concentration de 15 mg/L (~ 50 µM). Cette même formulation entraîne également une diminution significative de plus de 30% du nombre de cellules bactériennes présentes sur les feuilles d'une plante marine pour une concentration testée de tébuconazole formulé de 500 µg/L (1,7 µM) [Bundschuh *et al.*, 2011].

Le fongicide tébuconazole, pur ou formulé, semble donc présenter une certaine toxicité vis-à-vis des bactéries, notamment Gram positif.

III. Conclusions générales

D'après les résultats obtenus précédemment avec les deux pesticides étudiés (mésotrione et tébuconazole), quelques conclusions générales peuvent être émises :

- l'impact de la matière active dépend de la structure chimique du pesticide et de ses propriétés physico-chimiques : la mésotrione n'a que peu d'impact sur la croissance bactérienne, même à des concentrations très fortes (1 mM = 339 mg/L) tandis que le

tébuconazole, beaucoup moins hydrosoluble, a montré une activité antibactérienne croissante avec sa concentration, surtout contre les bactéries à Gram positif.

- les deux formulations, Callisto® et Balmora®, ont montré des toxicités beaucoup plus importantes que les matières actives pour la même gamme de concentrations testée. Le Balmora® paraît plus toxique que le Callisto®. Par exemple, une concentration de 20 µM de Balmora® a plus inhibé la croissance bactérienne de la souche *Bacillus* sp. 3B6 qu'une concentration de 25 µM de Callisto® (18 % contre 9 %), mais cette importante toxicité du Balmora® peut être due à la matière active, qui est, lorsqu'il y a un impact, nettement plus toxique que la mésotrine pure. De même, les résultats obtenus avec la levure, *Candida albicans* CIP 444, montre qu'elle est beaucoup plus résistante vis-à-vis du Callisto® que du Balmora® puisqu'il lui faut une concentration 5 fois plus grande pour arriver à une inhibition totale. Il est clair que les adjuvants présents dans la formulation augmentent significativement la toxicité des matières actives dans tous les cas.

- les bactéries Gram positif sont beaucoup plus sensibles quel que soit le composé, pur ou formulé, que les Gram négatif. Ces résultats sont conformes à ceux de la littérature décrits pour d'autres xénobiotiques organiques ou métalliques [Trudgill *et al.*, 1971 ; Harrop *et al.*, 1989 ; Guven *et al.*, 2003 ; Suresh *et al.*, 2010]. La membrane externe des cellules Gram négatif joue un rôle efficace de barrière de diffusion, diminuant la perméabilité vis-à-vis notamment des composés hydrophobes et empêche la pénétration du xénobiotique dans la cellule, la protégeant ainsi. Il a été également évoqué la composition plus riche en lipides et plus spécifiquement en lipopolysaccharides de la membrane externe qui « adsorberait » les composés peu hydrosolubles en les empêchant donc de pénétrer dans la cellule [Trudgill *et al.*, 1971].

- Une modulation des taux de biodégradation de la mésotrine dans ces conditions de croissance bactérienne par rapport aux conditions précédentes, ce qui était attendu. La concentration en cellules bactériennes moindre (évaluation difficile puisque nous sommes en croissance mais dans ces expériences, la DO max se situe généralement autour de 1 alors que dans les expériences de biodégradation, la DO/10 est autour de cette valeur) et la présence d'un milieu nutritif, même « pauvre », ont conduit à une diminution des taux de biodégradation par les souches dégradantes sauf pour *E. coli* qui dégrade de manière beaucoup plus efficace la mésotrine dans ces conditions (Tableau 29). Certes les concentrations inhibitrices de la dégradation sont plus grandes que celles observées dans cette partie, mais il y a une corrélation significative entre la toxicité de la formulation sur la

croissance des souches bactériennes Gram positif (*Bacillus* sp. 3B6 et IB11) et l'effet inhibiteur croissant sur la biodégradation avec la concentration. De même, pour *E. coli*. qui s'est montrée ici beaucoup plus affectée négativement par la formulation que dans les tests de biodégradation. Il faut noter que les souches non dégradantes n'acquièrent pas cette capacité dans les conditions des tests de croissance.

Tableau 29 : Comparaison du pourcentage de biodégradation de la mésotrione pure (P) et formulée (F) à 500 µM après 24 heures d'incubation par les souches dégradantes entre les tests de biodégradation et les tests de croissance

	Biodégradation		Croissance	
	P	F	P	F
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	100 %	57,5 %	10 %	2,5 %
<i>Bacillus</i> sp. IB11	100 %	16 %	32 %	0 %
<i>Bacillus</i> sp. IB4	100 %	—	69,5 %	0 %
<i>Bacillus</i> sp. 7B11	49,2 %	49,7 %	63,5 %	0 %
<i>E. coli</i>	49,7 %	78 %	90,5 %	38,3 %

L'ensemble de ces résultats (impact sur la croissance et sur la biodégradation) montre que l'étude des matières actives de pesticides ne suffit pas pour prédire la toxicité et l'impact de ces composés sur les microorganismes de l'environnement (ni même la biodégradation). Les adjuvants ont également un rôle très important certes sur les propriétés de solubilité, de pénétration dans la plante, d'augmentation de l'activité pesticide du composé ... mais aussi sur le devenir du pesticide lui-même et sur les effets vis-à-vis des écosystèmes microbiens. Il serait donc nécessaire, pour avoir une vision complète, de travailler avec non seulement la matière active, mais aussi avec les différents adjuvants de la formulation seuls ou en mélange. La difficulté réside ici dans le fait de connaître ces adjuvants, tenus secrets par les industriels. Les seules données, facilement accessibles au public, sont celles reportées sur les fiches de sécurité.

Les adjuvants connus de Callisto® sont l'octan-1-ol (5-10% W/W) et l'isodécyl alcool polyéthylène glycol (PEO 10-6, CAS 61827-42-7) (20-30% W/W). Pour l'octan-1-ol, plusieurs études ont montré son innocuité sur différentes bactéries à de telles concentrations [Playne and Smith, 1983 ; Marinova et Yankov, 2009]. Le PEO 10-6 (Figure 125), qui est

présent dans un rapport pratiquement de 5 pour 1 par rapport à la mésotrione, est répertorié sous de très nombreuses appellations dont la plus célèbre est le TREND90® (DuPont). Il s'agit d'un mouillant, qui en diminuant la tension superficielle de la formulation, permet une réduction de la taille des gouttelettes issues de la buse, formant ainsi un film tenace et uniforme sur toute la surface des feuilles. Il permet ainsi d'augmenter l'adhérence et la pénétration dans les feuilles. Ce composé, tensioactif non ionique appartenant à la famille des alcool éthoxylates, est utilisé dans de nombreuses formulations de pesticides. Si plusieurs études ont porté sur les bienfaits de cet adjuvant en termes de rendement de production et d'efficacité liée au maintien des résidus du pesticide sur les feuilles [Adamczewski et Matysiak, 2006 ; Ryckaert *et al.*, 2007 ; nombreux brevets], peu de publications se focalisent sur sa toxicité et son devenir dans l'environnement. Il a été cependant montré que ce pouvoir d'étalement sur la feuille de la formulation entraîne également une forte accélération de la photolyse de la mésotrione sur celle-ci [Lavieille *et al.*, 2009]. Quelques références bibliographiques pour d'autres tensioactifs de la même famille, sont cependant disponibles : biodégradables en aérobiose selon les critères des tests OECD (production de CO₂ supérieure à 60% de la valeur théorique après 28 jours d'incubation avec une communauté mixte issue de station d'épuration en bouteille fermée ; Tests réalisés sur des alcool éthoxylates de longueur de chaîne C12-C15) [Madsen *et al.*, 1996] mais aussi partiellement en anaérobiose [Huber *et al.*, 2000], ils sont généralement décrits comme toxiques pour les organismes aquatiques (*Daphnia magna*, *Vibrio fischeri*, *Kirchneria subcapita*...) [Madsen *et al.*, 1996 ; Jahan *et al.*, 2008 ; Nobels *et al.*, 2011]. Cette toxicité révélée de membres de cette même famille est tout à fait en accord avec les résultats obtenus lors de nos études. Cet adjuvant, même si ce n'est peut être pas le seul, pourrait être à l'origine des effets drastiques d'inhibition de la croissance des microorganismes testés, notamment sur les bactéries Gram positif.

Pour le Balmora®, le seul adjuvant connu est le N,N diméthyl-décanamide (> 25% W/W) répertorié comme irritant de la peau et des yeux et décrit comme présentant une toxicité aiguë en cas d'ingestion chez le rat [Fiche de données de sécurité]. Il est présent dans de nombreuses formulations de pesticides, notamment en association avec le tébuconazole comme le Folicur®, le Helocur® ou le Balmora®. Il s'agit d'un photo-protecteur, qui est également présent dans des préparations de cosmétiques adaptés pour protéger la peau ou les

cheveux contre les dommages solaires. A notre connaissance, il n'y a pas de données bibliographiques sur la toxicité du N,N diméthyl-décanamide vis-à-vis de microorganismes.

Cet effet négatif des adjuvants a déjà été montré sur un ou deux exemples de pesticide, le plus célèbre étant le glyphosate, numéro 1 des herbicides à travers le monde. Plusieurs études ont montré qu'un des principaux adjuvants des formulations du glyphosate, appartenant à la famille des alkylamines polyéthoxylées, présentait une toxicité aigüe beaucoup plus importante que celle de la matière active seule sur différents organismes aquatiques (*Daphnia*, truite, crevettes...), l'effet combiné étant de plus beaucoup plus fort que la somme des effets de chaque ingrédient séparé [Servisi *et al.*, 1987 ; Brausch et Smith, 2007]. Ces adjuvants éthoxylés ont également été montrés comme les composés toxiques des formulations du glyphosate vis-à-vis de cellules humaines, causant des effets sur l'intégrité des membranes et même des nécroses [Mesnage *et al.*, 2012 et références citées].

Il est donc clair que les adjuvants, ajoutés dans la formulation pour améliorer l'efficacité de la matière active et donc diminuer son dosage, présentent dans de nombreux cas des toxicités importantes pour des organismes variés et contribuent en fait à des impacts négatifs sur l'environnement.

Impact du mélange de deux pesticides, la mésotrione et le tébuconazole, purs ou formulés, sur leur biodégradation et la croissance de souches bactériennes

Après avoir étudié l'impact de mélanges de composés d'une matière active et d'adjuvants (formulation) en termes de biodégradation et de toxicité, nous avons voulu étudier les possibles modifications du comportement biodégradatif de différentes souches bactériennes en présence d'un mélange de deux pesticides, purs ou formulés, ainsi qu'en termes de toxicité (inhibition de croissance). En effet, d'une part, l'utilisation de cocktails de pesticides est très courante à l'heure actuelle dans les nouvelles pratiques agricoles, permettant d'améliorer l'effet recherché en ciblant une plus large gamme de nuisibles (mauvaises herbes, parasites ...) ; d'autre part, la présence de multi-contaminants dans les différents compartiments environnementaux des zones agricoles, notamment, n'est pas rare et les microorganismes de ces écosystèmes sont confrontés à ces mélanges de pesticides.

Nous avons poursuivi ces travaux avec les pesticides étudiés, la mésotrione et le tébuconazole, même si en termes d'épandage, ils n'ont aucune chance de se rencontrer, la mésotrione étant un herbicide du maïs et le tébuconazole un fongicide du blé. Cependant, ce dernier est relativement persistant dans les sols et est très souvent détecté dans les eaux [cf. partie bibliographique]. Il pourrait donc se retrouver ponctuellement en présence de mésotrione lors de rotations culturales blé/maïs ou dans les compartiments aquatiques connexes.

Nous avons donc étudié l'effet du mélange sur la cinétique et le métabolisme dégradatif de la mésotrione et du tébuconazole, purs ou formulés, et sur l'inhibition de croissance de diverses souches bactériennes. Pour essayer d'avoir un large panel de situations, nous avons travaillé avec :

- une souche, *Bacillus* sp. 3B6, dégradant ces deux pesticides,
- trois souches dégradant la mésotrione mais ne dégradant pas le tébuconazole : *Bacillus* sp. IB10, *Bacillus* sp. IB11 et *E. coli* ATCC 11303,
- une souche dégradant le tébuconazole mais ne dégradant pas la mésotrione : *Pseudomonas putida* ATCC 21244.

Nous avons tout d'abord vérifié l'absence de réactivité chimique entre la mésotrione et le tébuconazole, purs et formulés, en mettant en contact, dans les mêmes concentrations et les mêmes conditions d'incubation que pour les expériences de biodégradation, des solutions contenant chacun des pesticides, et en suivant leur évolution. Aucune modification des concentrations initiales n'a été observée lors des analyses HPLC sur les échantillons prélevés pendant 5 jours d'incubation pour le mélange de matières actives et celui des formulations.

Pour tenter de clarifier l'analyse des résultats, une présentation par type de souches sera réalisée.

I. Etude de l'effet du mélange sur la souche *Bacillus* sp. 3B6 dégradant la mésotrione et le tébuconazole

I.1. Effet du mélange sur la biodégradation des deux pesticides

I.1.1 Biodégradation en conditions classiques

A partir de 500 mL de culture, les cellules bactériennes de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en phase de repos métabolique sont mises à incuber à 27°C et sous agitation de 200 rpm, dans 100 mL d'une solution de mésotrione 250 µM (pure ou formulée) seule ou en mélange avec une solution de tébuconazole 75 µM (pur ou formulé). Ces concentrations ont été choisies (i) pour que la cinétique de biodégradation ne soit pas trop rapide avec la matière pure et ne soit pas inhibée par la formulation et (ii) que les métabolites des deux pesticides puissent être facilement détectables pour suivre leur évolution et donc observer de potentielles modulations.

La comparaison des cinétiques de biodégradation de la mésotrione pure (Figure 144A) et du tébuconazole pur (Figure 144B) ne met pas en évidence des différences très significatives entre les deux expériences. Nous retrouvons avec cette souche le phénomène de biosorption du tébuconazole avec une concentration initiale mesurée de 38 μM au lieu des 75 μM théoriques attendus. Nous pouvons simplement noter une petite augmentation du taux de biodégradation du tébuconazole en présence de mésotrione (74% au lieu de 64% après 72h d'incubation).

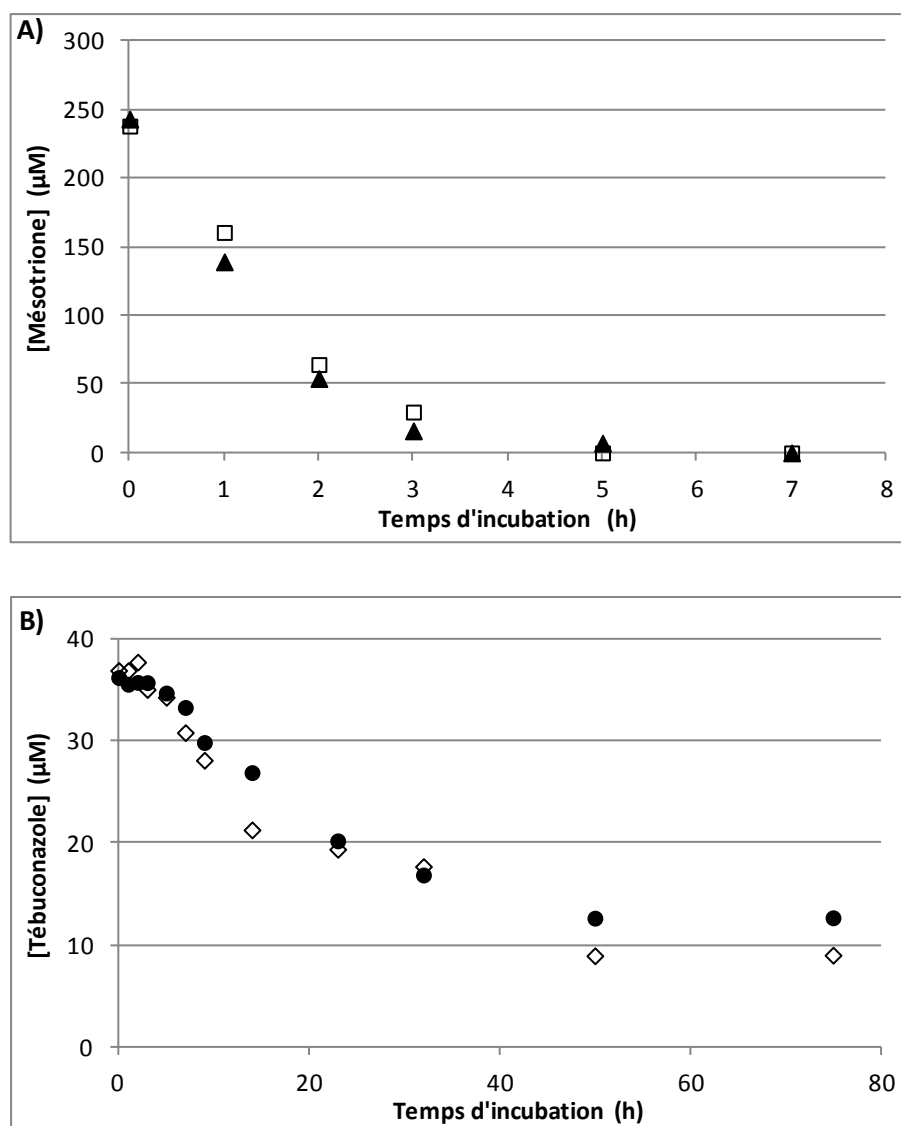


Figure 144: Influence de la présence (A) du tébuconazole (75 μM) sur la biodégradation de la mésotrione (250 μM) et (B) de la mésotrione (250 μM) sur le tébuconazole (75 μM) par la souche *Bacillus sp. 3B6*. Mésotrione seule (\blacktriangle), Mésotrione mélange (\square), Tébuconazole seul (\bullet), Tébuconazole mélange (\diamond)

En termes de métabolites, ce sont les mêmes qui sont détectés dans les expériences pesticides seuls et en mélange. Pour les métabolites de la mésotrione, aucune différence très significative n'a été notée en présence du tébuconazole en termes de cinétique d'apparition et de disparition, ni en termes de concentrations. Il faut dire que la cinétique de biodégradation de la mésotrione est relativement rapide puisqu'elle est complètement biotransformée en 5h d'incubation. Par contre, pour les métabolites du tébuconazole, les concentrations des deux métabolites **M1** et **M2** sont clairement moins importantes en présence de la mésotrione (Figure 145), alors que le taux de biodégradation est un peu plus important.

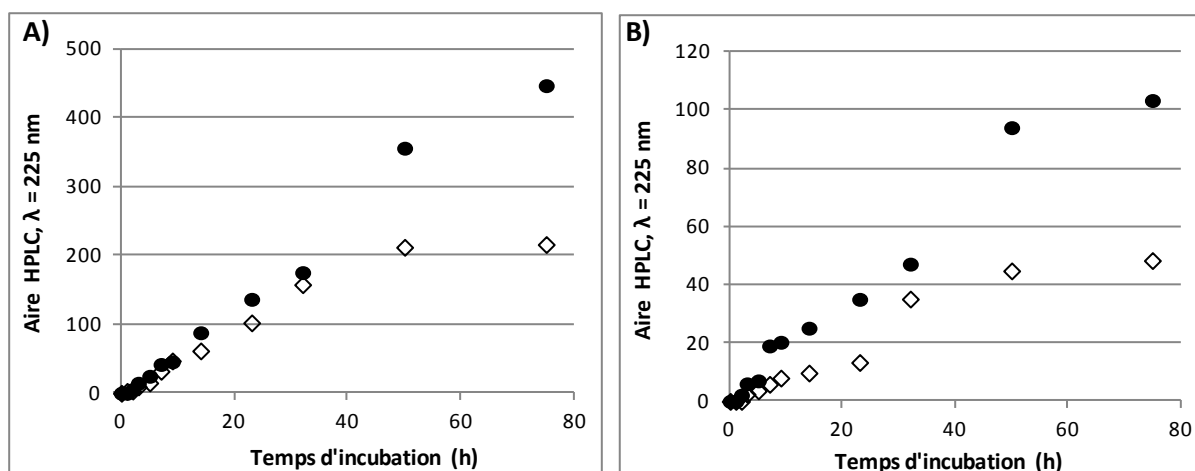


Figure 145 : Influence de la présence de mésotrione (250 µM) sur la cinétique d'apparition des métabolites M1(A) et M2 (B) lors de la biodégradation du tébuconazole (75 µM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6.
Tébuconazole seul (●), Tébuconazole mélange (◇)

Cette différence peut être expliquée par deux hypothèses : soit la présence de la mésotrione induit la mise en place d'autres voies métaboliques de biodégradation du tébuconazole et de nouveaux métabolites sont formés (que nous ne détectons pas ni en UV, ni en FLD dans nos conditions d'analyses) ; soit nous observons une accélération de la biodégradation/minéralisation et les cinétiques de transformation de ces métabolites en composés assimilables par la bactérie sont accélérées, par exemple du fait d'un apport d'énergie liée à la biodégradation de la mésotrione.

Nous avons réalisé la même expérience avec les deux pesticides formulés, seuls ou en mélange, en utilisant les mêmes concentrations en matière active que précédemment (mésotrione 250 µM et tébuconazole 75 µM). Si aucune différence très significative n'est observée avec le Callisto®, la dégradation étant toujours très rapide (Figure 146A), le

tébuconazole formulé (Balmora®), lui, est beaucoup mieux dégradé en présence de Callisto® avec un pourcentage de biodégradation de 83% au lieu de 54% lorsqu'il est seul (Figure 146B).

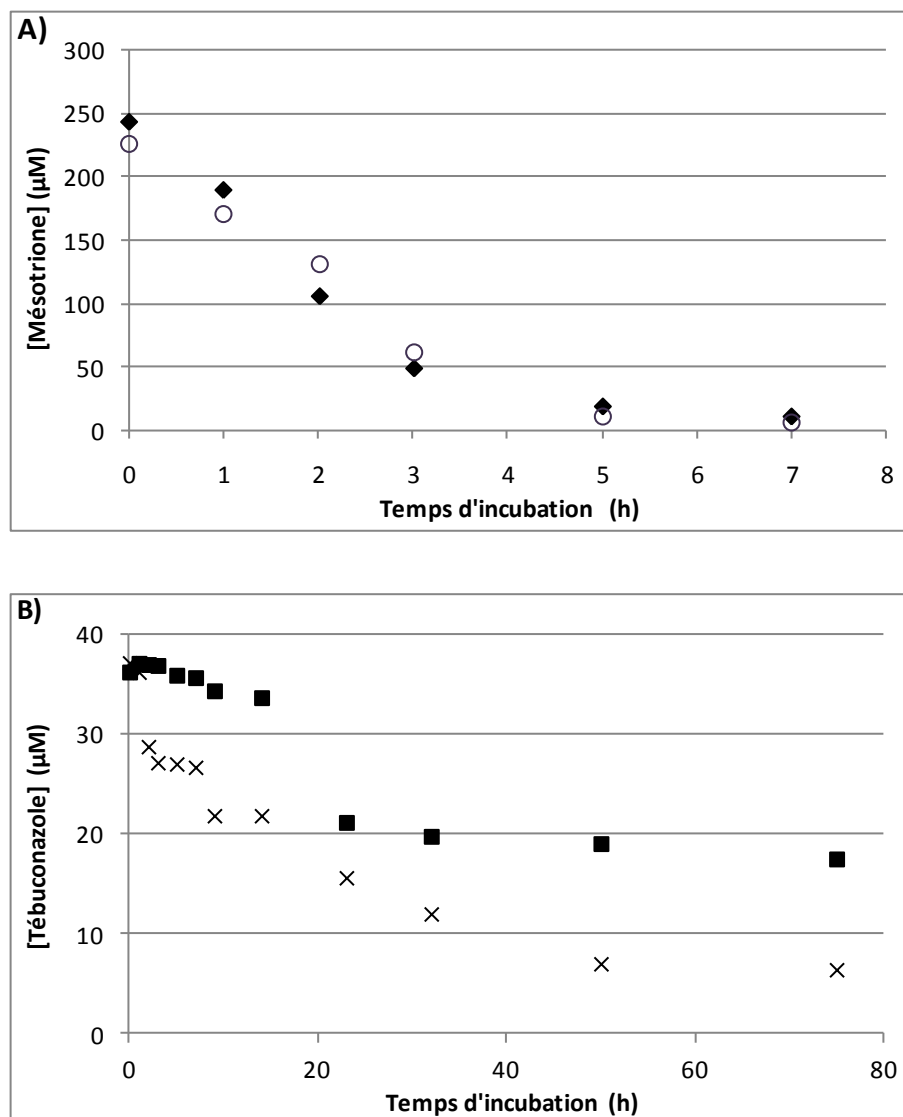


Figure 146 : Influence de la présence (A) du Balmora® (tébuconazole = 75 µM) sur la biodégradation du Callisto® (mésotrione = 250 µM) et (B) du Callisto® (mésotrione = 250 µM) sur le Balmora® (tébuconazole = 75 µM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Callisto® seul (◆), Callisto® mélange (○), Balmora® seul (■), Balmora® mélange (×)

La Figure 146 montre clairement l'effet stimulant de la présence du Callisto® sur la biodégradation du tébuconazole formulé avec une disparition continue jusqu'à 48h d'incubation alors que seul, une phase de dégradation plus lente apparaît dès 23h d'incubation dans le cas du Balmora®.

Le suivi des métabolites de la mésotrione et du tébuconazole a également été effectué au cours de cette expérience (Figure 147). L'effet est beaucoup plus significatif sur les métabolites de la mésotrione que sur ceux du tébuconazole. En effet, les métabolites de la mésotrione sont plus concentrés dans le cas du mélange des formulations (Figures 147A et B). De plus, la disparition de M2 (Figure 147A) est beaucoup plus rapide dans le cas du mélange.

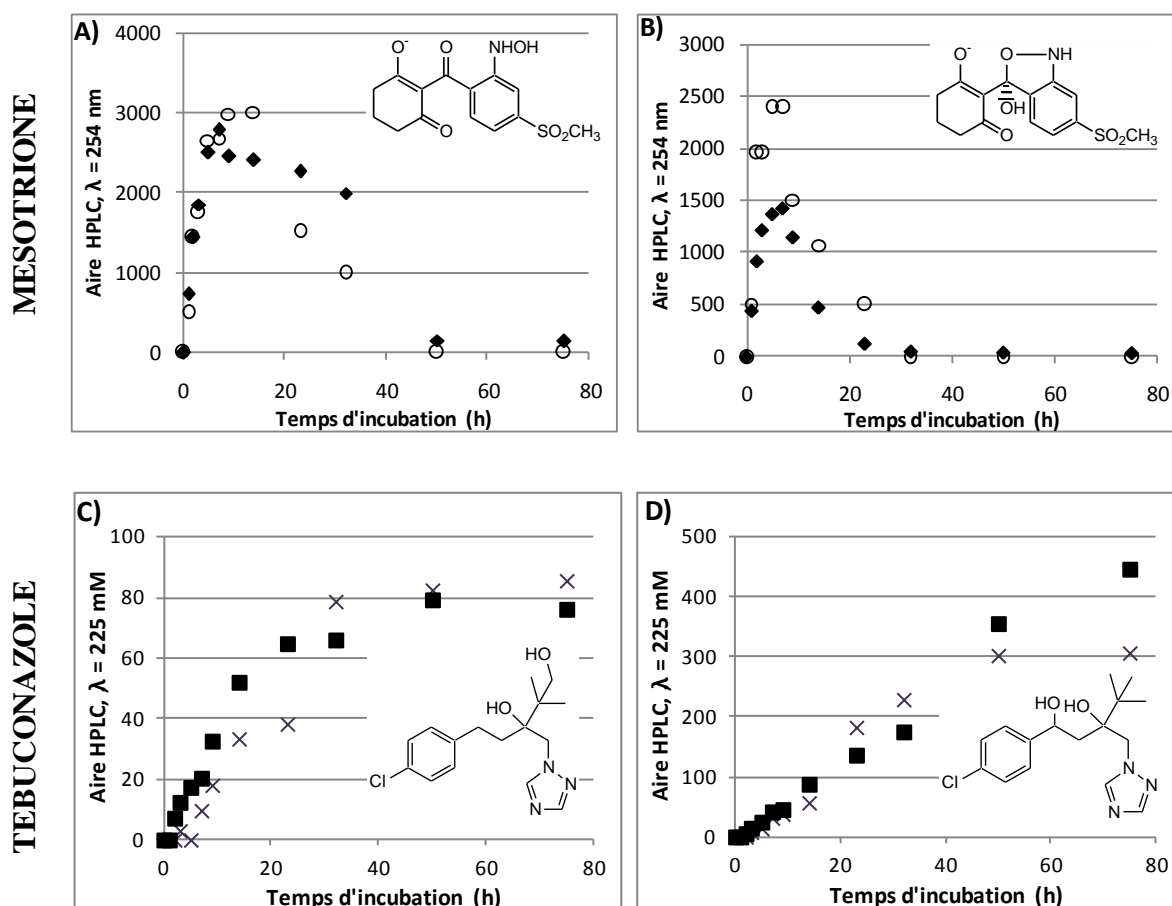


Figure 147 : Influence de la présence (en haut) du Balmora® (tébuconazole = 75 µM) sur l'évolution des métabolites M2 (A) et M3 (B) lors de la biodégradation de la mésotrione formulée (250 µM) et (en bas) du Callisto® (mésotrione = 250 µM) sur l'évolution des métabolites M1 (C) et M2 (D) lors de la biodégradation du tébuconazole formulé (75 µM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Callisto® seul (◆), Callisto® mélange (○), Balmora® seul (■), Balmora® mélange (×)

Il n'y a donc pas forcément correspondance entre influence du mélange sur les cinétiques d'évolution de la molécule mère et de ses métabolites. En effet, ici, avec les formulations, nous n'observons pas d'effet sur la mésotrione mais uniquement sur les métabolites et pour le tébuconazole, un gros effet sur la matière active et peu sur les métabolites. Ces observations ne sont pas vraiment étonnantes puisque d'une part les pas de

temps ne sont pas les mêmes et d'autre part, les enzymes impliquées dans les différentes étapes de transformation sont différentes.

Pour jouer sur ces effets cinétiques et observer des modulations plus significatives sur la disparition de la molécule mère et l'apparition des métabolites, nous avons décidé de travailler avec moins de cellules et donc une biomasse plus faible.

I.1.2 Influence de la biomasse

Nous avons donc repris le même protocole que précédemment mais cette fois-ci, en travaillant avec une biomasse correspondant à 200 mL de culture (au lieu des 500 mL du protocole classique). Les mêmes concentrations de pesticides purs ou formulés ont été utilisées : 250 μ M de mésotrione et 75 μ M de tébuconazole.

La biotransformation de la mésotrione pure (250 μ M) est logiquement moins rapide à cause de la diminution de la quantité de cellules mises en incubation (Figure 148A). Elle est également incomplète (70% de dégradation) et s'arrête après 12h d'incubation. Par contre, en mélange avec le tébuconazole pur, la disparition de la mésotrione est quasi-complète (96%) après 30h d'incubation. Le ralentissement des cinétiques de biodégradation nous a donc permis de mettre en évidence un effet stimulant du mélange de pesticides sur la biodégradation de la mésotrione. Par contre, aucun effet du mélange n'est noté sur la disparition du tébuconazole (Figure 148B).

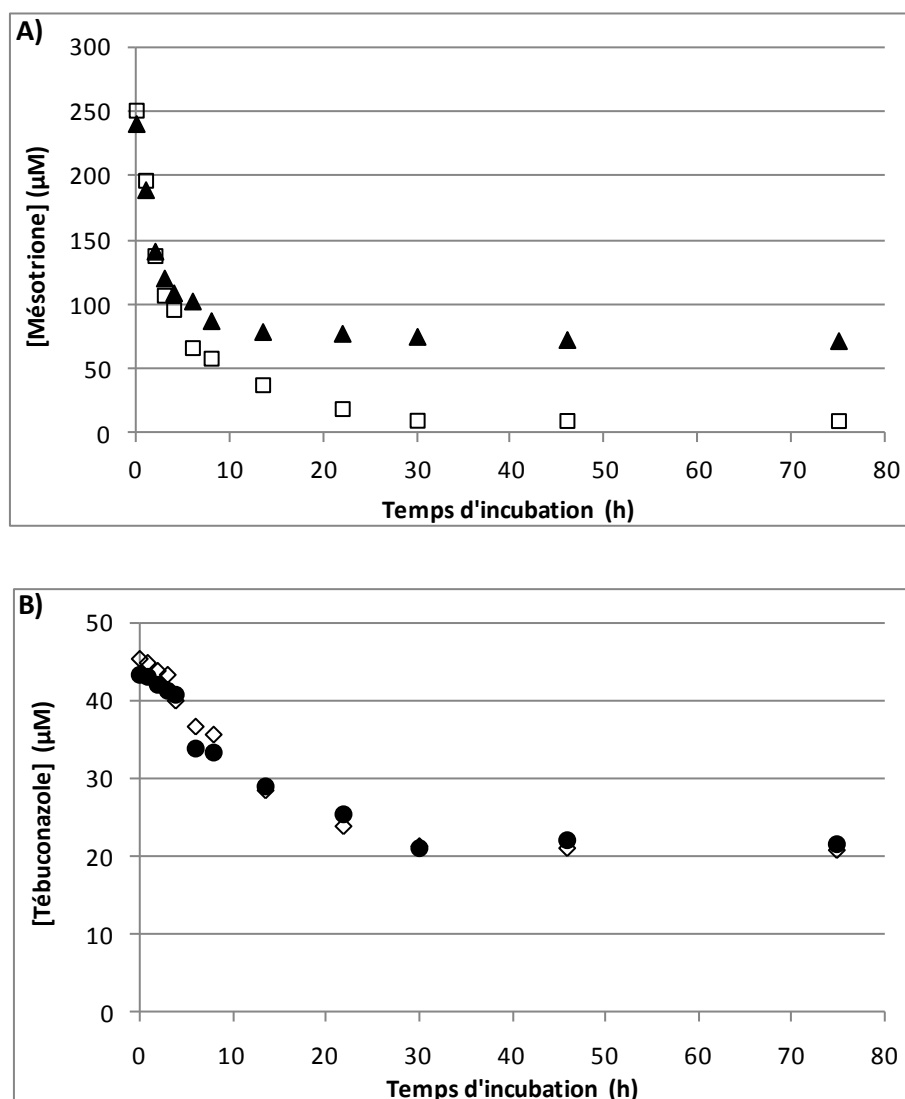


Figure 148 : Influence de la présence (A) du tébuconazole (75 μM) sur la biodégradation de la mésotrione (250 μM) et (B) de la mésotrione (250 μM) sur le tébuconazole (75 μM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Mésotrione seule (▲), Mésotrione mélange (□), Tébuconazole seul (●), Tébuconazole mélange (◇)

Comme précédemment, les métabolites de la mésotrione (**M2**, **M3** et **AMBA**) ne sont pas visiblement affectés par la présence de tébuconazole (Figures 149A et B), ni en termes d'évolution, ni en termes de concentration. Les seules différences observées sont liées à la variation de la cinétique de la molécule mère. Pour ceux du tébuconazole, les concentrations de M1 et de M2 sont légèrement plus importantes pour le mélange (Figures 149C et D) alors que la biodégradation du tébuconazole n'est pas du tout affectée. Ceci confirme les résultats précédents où l'effet sur les métabolites n'est pas toujours proportionnel à la cinétique de biotransformation du tébuconazole.

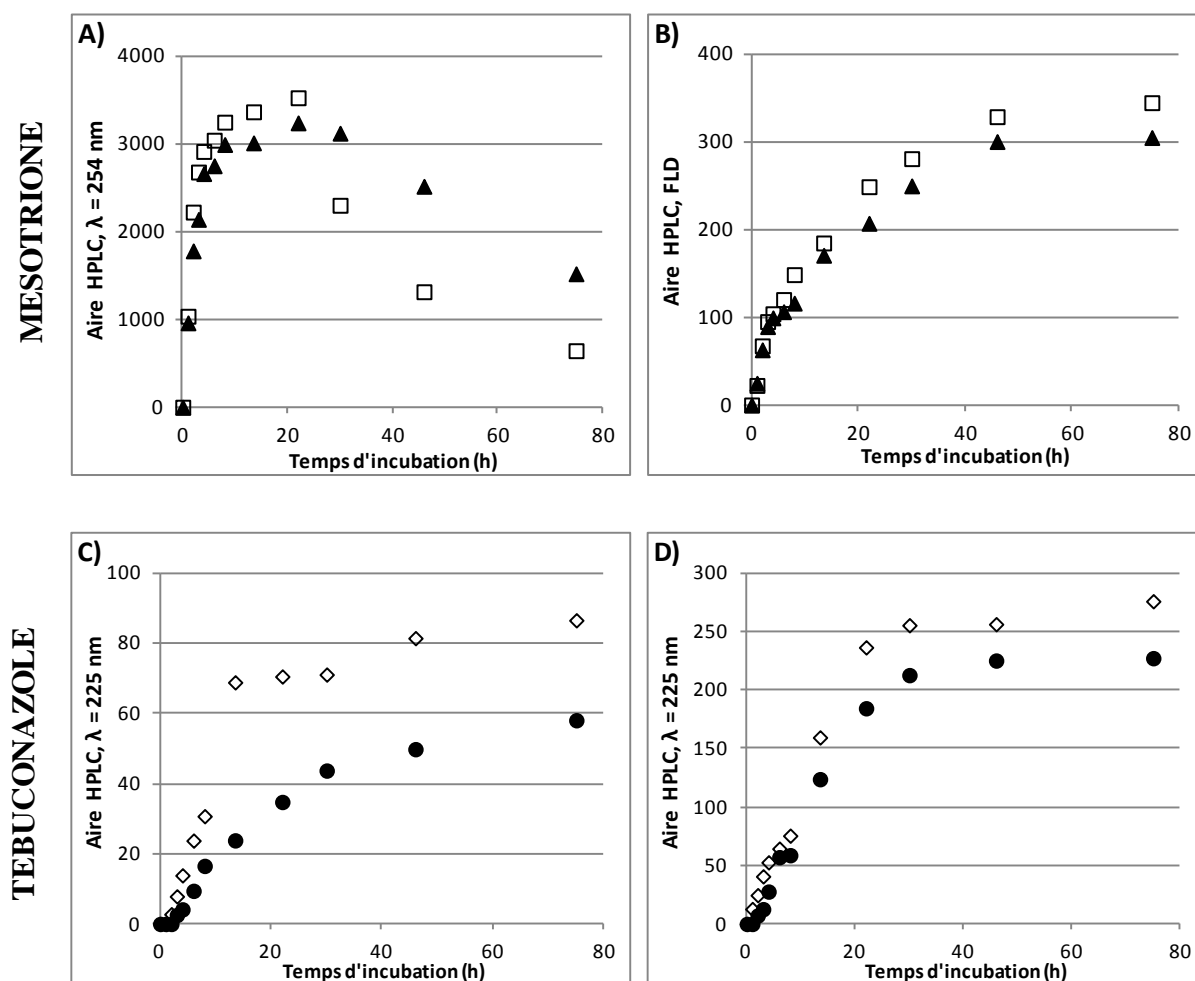


Figure 149 : Influence de la présence (en haut) du tébuconazole (75 μM) sur l'évolution des métabolites M2 (A) et AMBA (B) lors de la biodégradation de la mésotrione (250 μM) et (en bas) de la mésotrione (250 μM) sur l'évolution des métabolites M1 (C) et M2 (D) lors de la biodégradation du tébuconazole (75 μM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Mésotrione seule (▲), Mésotrione mélange (□), Tébuconazole seul (●), Tébuconazole mélange (◇)

Avec les pesticides formulés, les conclusions sont assez proches. Nous retrouvons le fait que la mésotrione formulée est un peu moins bien biodégradée que la matière active pure (Figure 150A). La présence du Balmora® semble légèrement ralentir la cinétique de biodégradation de la mésotrione formulée jusqu'à 12h d'incubation mais le taux final de biodégradation est similaire (~ 60%). Il semble ainsi que l'effet stimulant du mélange observé avec les matières actives pures soit masqué par l'effet toxique, inhibiteur des adjuvants des formulations. Pour le tébuconazole, nous retrouvons l'effet accélérateur de la présence de Callisto® sur sa biodégradation, un peu moindre que précédemment (mais il y a moins de cellules), avec une augmentation de 18% du taux de biodégradation (Figure 150B).

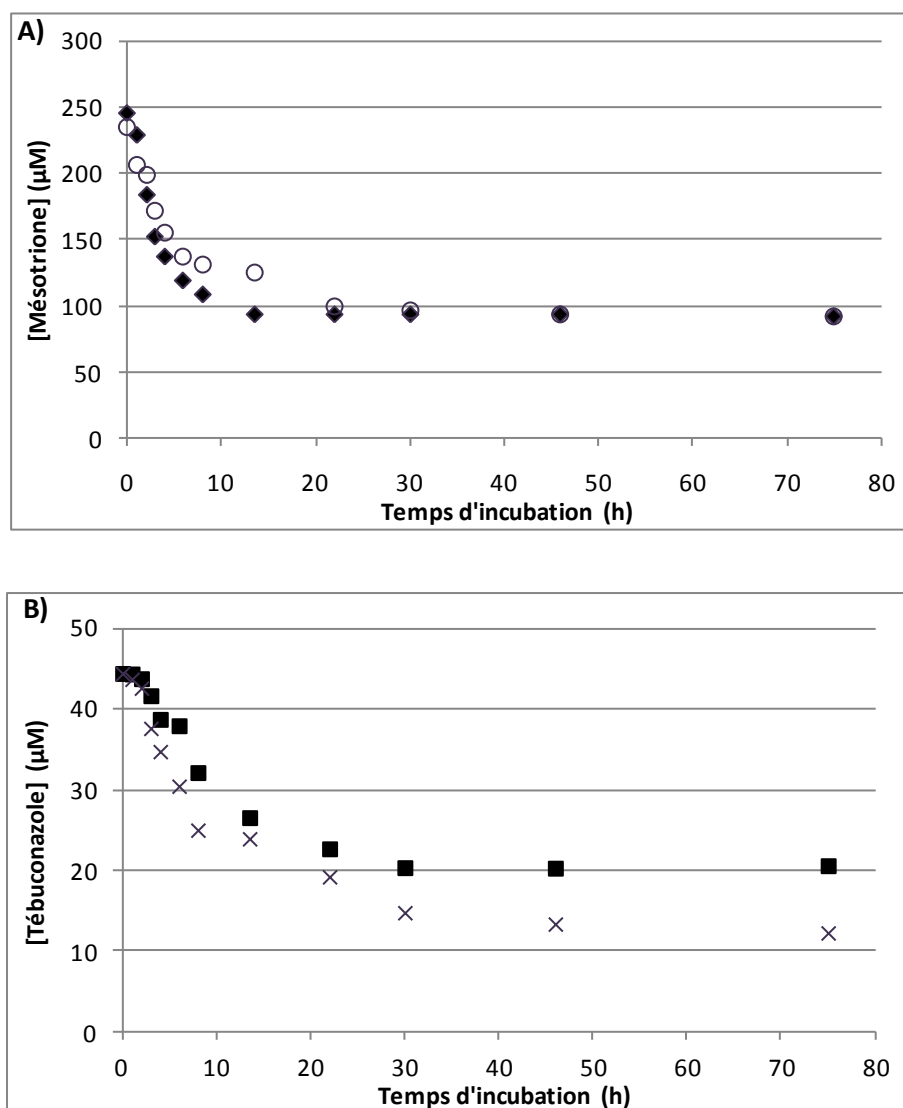


Figure 150 : Influence de la présence (A) du Balmora® (tébuconazole = 75 µM) sur la biodégradation du Callisto® (mésotrione = 250 µM) et (B) du Callisto® (mésotrione = 250 µM) sur le Balmora® (tébuconazole = 75 µM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Callisto® seul (◆), Callisto® mélange (○), Balmora® seul (■), Balmora® mélange (×)

L'effet ralentisseur du mélange de formulations sur la biodégradation de la mésotrione est confirmé par le suivi des trois métabolites, **M2**, **M3** et **AMBA**, dont les concentrations sont moins importantes dans le mélange (Figure 151). La mésotrione se dégrade moins et il y a moins de métabolites formés.

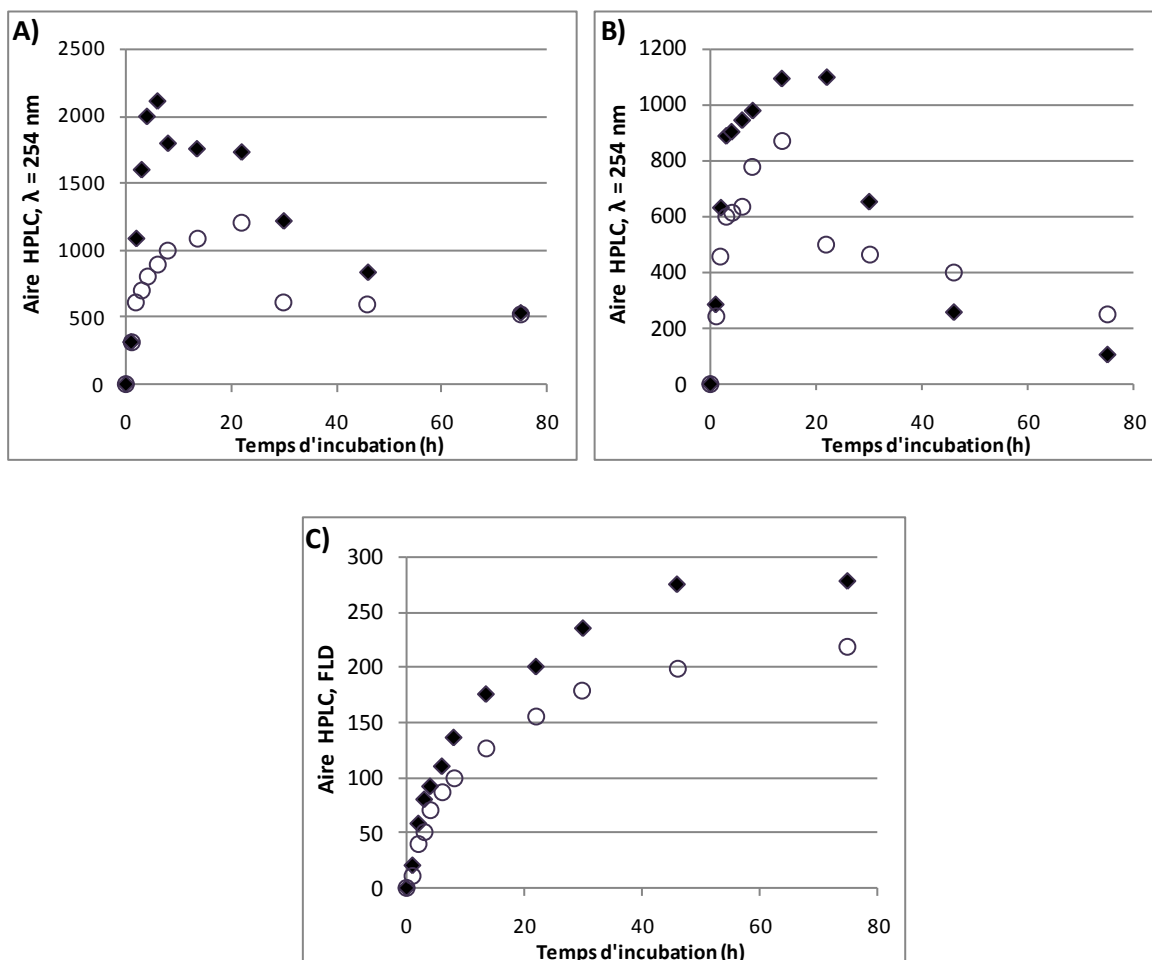


Figure 151 : Influence de la présence de Balmora® (tébuconazole = 75 µM) sur la cinétique d'apparition des métabolites M1(A), M2 (B) et AMBA (C) lors de la biodégradation du Callisto® (mésotrione = 250 µM) par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Callisto® seul (◆), Callisto® mélange (○)

Pour le tébuconazole, cette fois-ci l'apparition des métabolites suit l'accélération de la biodégradation en présence du Callisto®. Les métabolites M1 et M2 sont donc plus concentrés (Figure 152), en particulier M1 dont la concentration double par rapport à la molécule seule (Figure 152A).

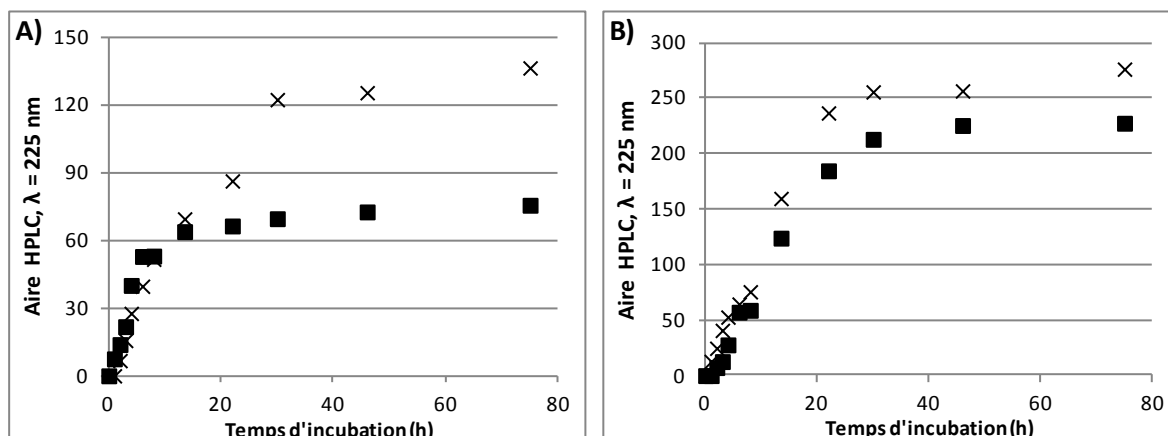


Figure 152 : Influence de la présence de Callisto® (tébuconazole = 75 μ M) sur la cinétique d'apparition des métabolites M1(A) et M2 (B) lors de la biodégradation du Balmora® (Tébuconazole = 75 μ M) par la souche *Bacillus* sp. 3B6. Balmora® seul (■), Balmora® mélange (×)

I.2. Effet du mélange de deux pesticides sur la croissance bactérienne

Pour essayer d'avoir une vision plus complète de l'impact de mélanges de pesticides purs ou formulés, nous avons réalisé quelques expériences de suivis de croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence des pesticides étudiés, en utilisant le même protocole que celui de la partie 3 (Milieu PC, suivi pendant 24h). Nous avons fixé la concentration en mésotrione à 250 μ M et avons fait varier celle en tébuconazole de 0 à 100 μ M. Deux essais ont été effectués en absence de tout pesticide en présence ou non d'éthanol pour vérifier la viabilité de la souche (témoin).

I.2.1 Effet du mélange de pesticides purs

Rappelons les résultats obtenus précédemment avec la souche *Bacillus* sp. 3B6 : la mésotrione pure est sans aucun effet sur la croissance de cette souche à cette concentration et le tébuconazole présente un effet toxique à partir d'une concentration de 50 μ M, allant même jusqu'à une inhibition totale pour 100 μ M (cf. Partie 3, résultats).

Les résultats obtenus pour les tests en mélanges des pesticides purs sont présentés sur la Figure 153.

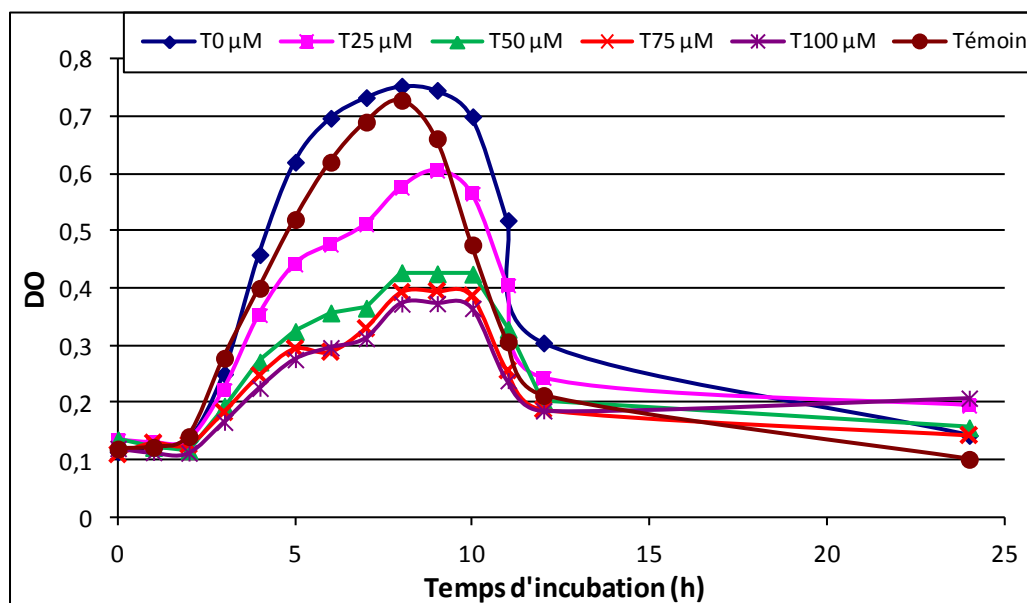


Figure 153 : Croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence du cocktail de matières actives (Mésotrione : 250 µM et concentrations variables de tébuconazole de 0 à 100 µM)

La mésotrione (250 µM) seule a ici un effet légèrement stimulant sur la croissance bactérienne. Cependant, dès l'ajout de tébuconazole à 25 µM, un effet inhibiteur est observé. Cet effet est ensuite le même quelle que soit la concentration (entre 50 et 100 µM). Par contre, aucune inhibition totale (observée avec le tébuconazole 100 µM seul) n'est notée. Ces résultats montrent que la toxicité du mélange est plus importante que la somme des effets de chaque pesticide séparé, à part pour la forte concentration en tébuconazole (100 µM). Par exemple, la mésotrione 250 µM et le tébuconazole 50 µM seuls n'ont aucun effet sur la croissance de cette souche alors que leur mélange l'a inhibée fortement (DO max diminuée de moitié). Ainsi, le mélange des deux pesticides a un effet synergique sur la souche bactérienne testée. Il faut noter que dans ces conditions, la souche *Bacillus* sp. 3B6 dégrade 30 % de la mésotrione 250 µM et 10 % du tébuconazole 50 µM après les 24h de croissance tandis que pour la plus grande concentration testée (100 µM), la dégradation de la mésotrione diminue (20 %) et le tébuconazole n'est pas du tout dégradé. Le taux de dégradation du tébuconazole, le plus toxique seul, est donc en corrélation avec la toxicité croissante des mélanges.

I.2.2 Effet du mélange de pesticides formulés

Nous avons voulu étudier également l'effet du mélange de pesticides formulés sur la croissance bactérienne de *Bacillus* sp. 3B6. Au vu des résultats obtenus précédemment avec chacun d'eux pour cette souche (inhibition totale de croissance pour 100 μM de Callisto® et 50 μM de Balmora®), nous avons dû diminuer fortement les concentrations des pesticides formulés mélangés testés, les formulations s'étant révélées beaucoup plus toxiques que les matières actives. Nous avons donc décidé, pour essayer de mettre en évidence des effets croisés, de travailler avec différentes concentrations de mésotrione formulée (Callisto®) variant de 5 à 75 μM - soit d'une absence d'effet sur la croissance (5 et 10 μM), à un effet légèrement retardé de la croissance (25 μM) jusqu'à des effets importants (50 μM avec une DO max diminuée par 2 et 75 μM avec une inhibition presque totale) – avec une concentration de tébuconazole formulé (Balmora®) variant de 0 à 30 μM - soit d'une absence d'effet sur la croissance (10 μM), à un effet retardé de la croissance (20 μM) jusqu'à une inhibition de la croissance par 2 (30 μM) (Figure 154).

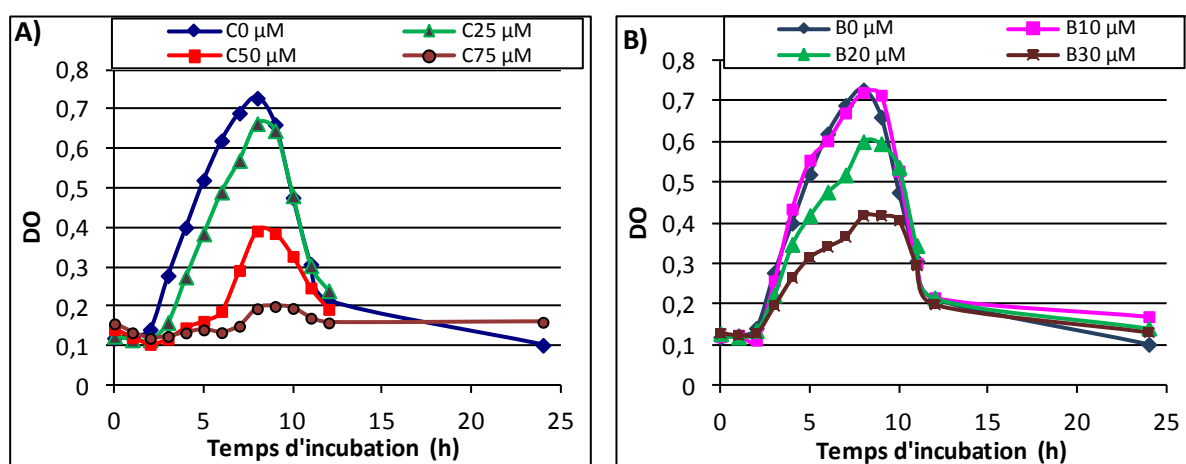


Figure 154 : Courbes de croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de concentrations croissantes de (A) mésotrione formulée (Callisto® = C) et (B) de tébuconazole formulé (Balmora® = B)

Les résultats obtenus pour les courbes de croissance réalisées avec des mélanges sont rassemblés sur la Figure 155. Ils montrent que la toxicité des mélanges est beaucoup plus forte que celle des pesticides séparés.

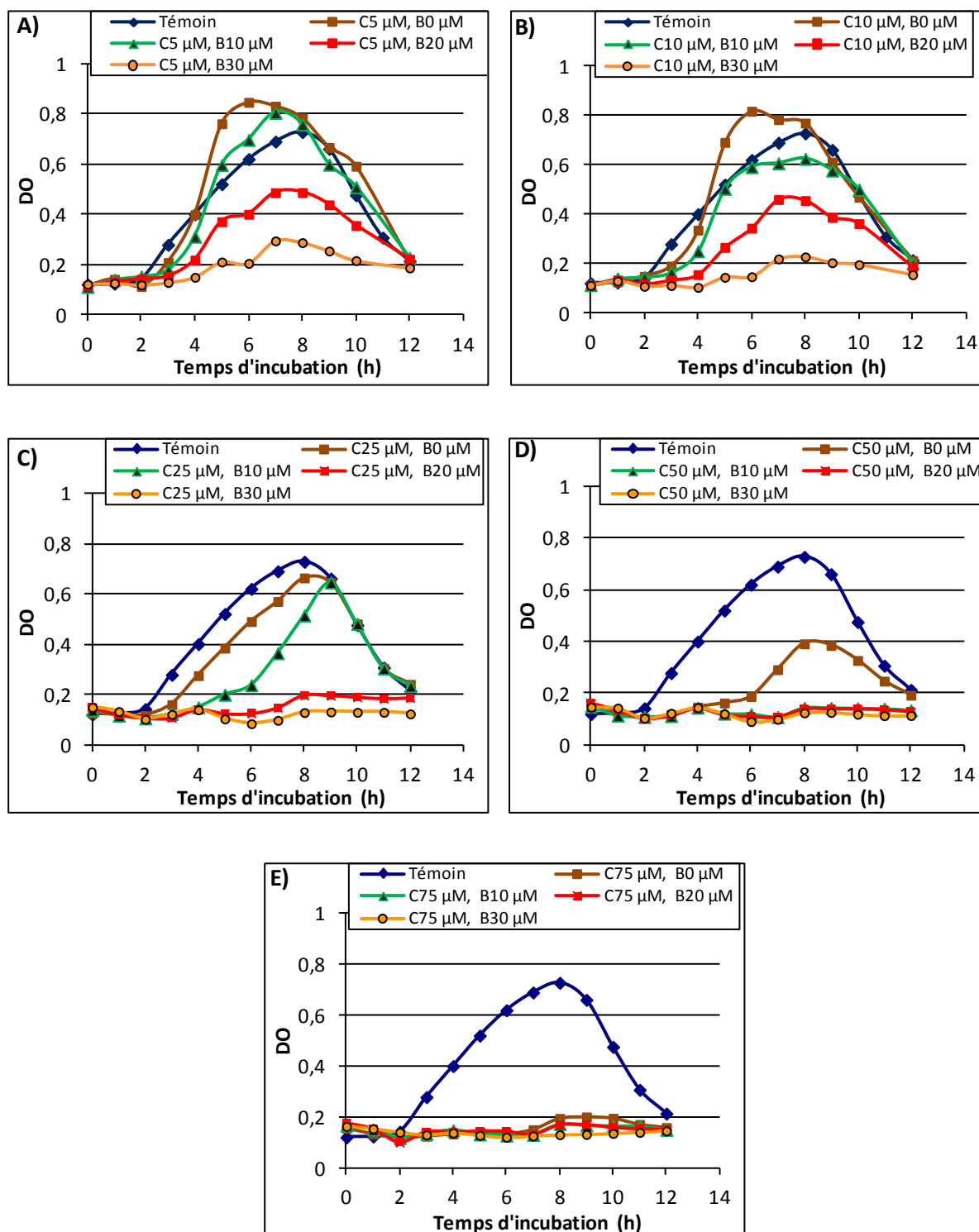


Figure 155 : Courbes de croissance de la souche *Bacillus* sp. 3B6 en présence de mélanges à différentes concentrations de mésotrione formulée (Callisto® = C) et de tébuconazole formulé (Balmora® = B)

Ainsi, dans les Figures 155A et B, on peut voir qu'en mélangeant de la mésotrione formulée à des concentrations ne présentant aucun effet toxique (5 et 10 μ M) avec une concentration de 30 μ M de tébuconazole formulé, qui inhibait de moitié la croissance, nous

observons une inhibition beaucoup plus importante de 70 à 80% de la croissance. L'effet inhibiteur observé est donc plus grand que l'addition des deux effets séparés. Les résultats sont encore plus nets avec le Callisto® 10 µM. Par exemple, la combinaison avec le Balmora® 10 µM inhibe clairement (40%) la croissance bactérienne tandis que chaque pesticide seul n'a aucun effet (Figure 155B). La présence d'un pesticide a donc renforcé la toxicité de l'autre. Avec des concentrations croissantes en Callisto® (Figures 155 C-E), le même effet synergique est observé avec des inhibitions totales là où chaque pesticide formulé seul n'avait qu'un effet mineur sur la croissance bactérienne (par exemple C25B20). Nous pouvons noter que la croissance en présence de Callisto® 5 et 10 µM est plus forte que celle du témoin, ce qui laisse penser à un co-métabolisme possible.

Remarque : Nous observons donc dans tous les cas un effet synergique de l'impact sur la croissance microbienne. La toxicité de mélange de pesticides, purs et formulés, est toujours plus grande que l'addition de la toxicité de chaque pesticide seul, pur ou formulé.

I.3. Conclusions

Les effets de mélanges de ces deux pesticides, purs ou formulés, sur la souche *Bacillus* sp. 3B6 sont assez contradictoires : côté dissipation, il n'y a soit pas d'effet sur la cinétique et le taux de biotransformation, soit un effet les boostant, et côté toxicité et impact sur la croissance, des effets synergiques inhibiteurs forts ont été observés dans tous les cas, le mélange étant plus toxique que la somme des toxicités observées pour chacun d'eux. L'utilisation des formulations est encore plus révélatrice de ces impacts toxiques. Par contre, les mêmes voies métaboliques sont observées, aucun nouveau signal n'ayant été détecté en HPLC. L'accélération des biodégradations ne peut pas forcément être corrélée à la concentration de métabolites trouvés (en particulier pour le tébuconazole).

II. Etude de l'effet du mélange sur des souches bactériennes dégradant la mésotrione mais pas le tébuconazole : *Bacillus* sp. IB10, *Bacillus* sp. IB11 et *Escherichia coli* ATCC 11303

L'objectif a ensuite été de tester un autre cas de figure pour ces deux mêmes pesticides en mélange. Nous avons réalisé le même type d'expériences avec trois autres souches

dégradant la mésotrione plus ou moins efficacement et pas du tout le tébuconazole (Des expériences avec le tébuconazole à différentes concentrations ont été réalisées avec chacune de ces souches dans les conditions classiques pour vérifier l'absence de biodégradation de ce pesticide): deux souches Gram positif, *Bacillus* sp. IB10 et IB11, et la souche Gram négatif *E. coli* ATCC 11303. Les deux souches de *Bacillus* sp. dégradent complètement la mésotrione 1 mM (Partie 1) avec une cinétique plus rapide pour IB11. Par contre *E. coli* dégrade la mésotrione 1 mM de manière incomplète (20 à 55% suivant la biomasse bactérienne utilisée) avec une cinétique lente.

Pour ces trois souches, nous n'avons pas fait les tests de croissance faute de temps.

II.1. Effet du mélange sur la biodégradation des deux pesticides par *Bacillus* sp. IB10

Le même protocole que celui décrit précédemment est utilisé avec cette souche : des cellules bactériennes venant de 200 mL de culture sont incubées, à 27°C et agitation à 200 rpm, avec une solution de 250 µM de la mésotrione, pure ou formulée, seule ou en présence d'une solution de tébuconazole 75 µM (seul ou formulé). Des prélèvements sont réalisés entre 0 et 80h d'incubation et les cinétiques de dégradation de la mésotrione 250 µM dans les différents cas testés sont suivies par HPLC.

Tout d'abord, les résultats obtenus avec la matière active seule ou en mélange sont présentés sur la Figure 156. La cinétique de biodégradation de la mésotrione pure peut se décrire en deux étapes : la première correspond à une cinétique rapide du 1^{er} ordre jusqu'à 12h d'incubation, puis une deuxième étape de biodégradation très lente est observée. Le taux de biodégradation de la mésotrione seule atteint 84%. La présence de tébuconazole 75 µM module la cinétique de biodégradation de la mésotrione 250 µM et nous observons alors une cinétique du 1^{er} ordre jusqu'à 48h d'incubation ($R^2 = 0,922$), qui conduit à un taux de dégradation de 95% de la mésotrione en mélange.

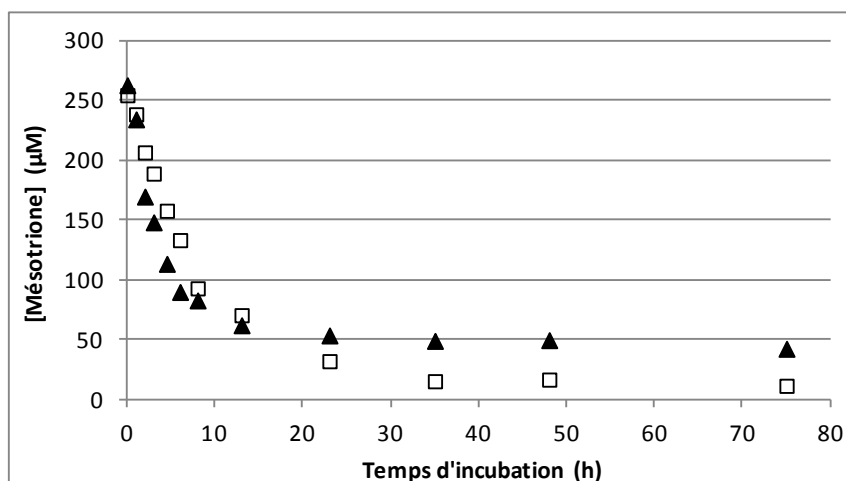


Figure 156 : Influence de la présence du tébuconazole (75 µM) sur la biodégradation de la mésotrione (250 µM) par la souche *Bacillus* sp. IB10. Mésotrione seule (▲), Mésotrione mélange (□)

Ces résultats sont très similaires à ceux observés précédemment avec *Bacillus* sp. 3B6. Ils sont corroborés par les cinétiques d'apparition et de disparition des métabolites de la mésotrione (Figure 157).

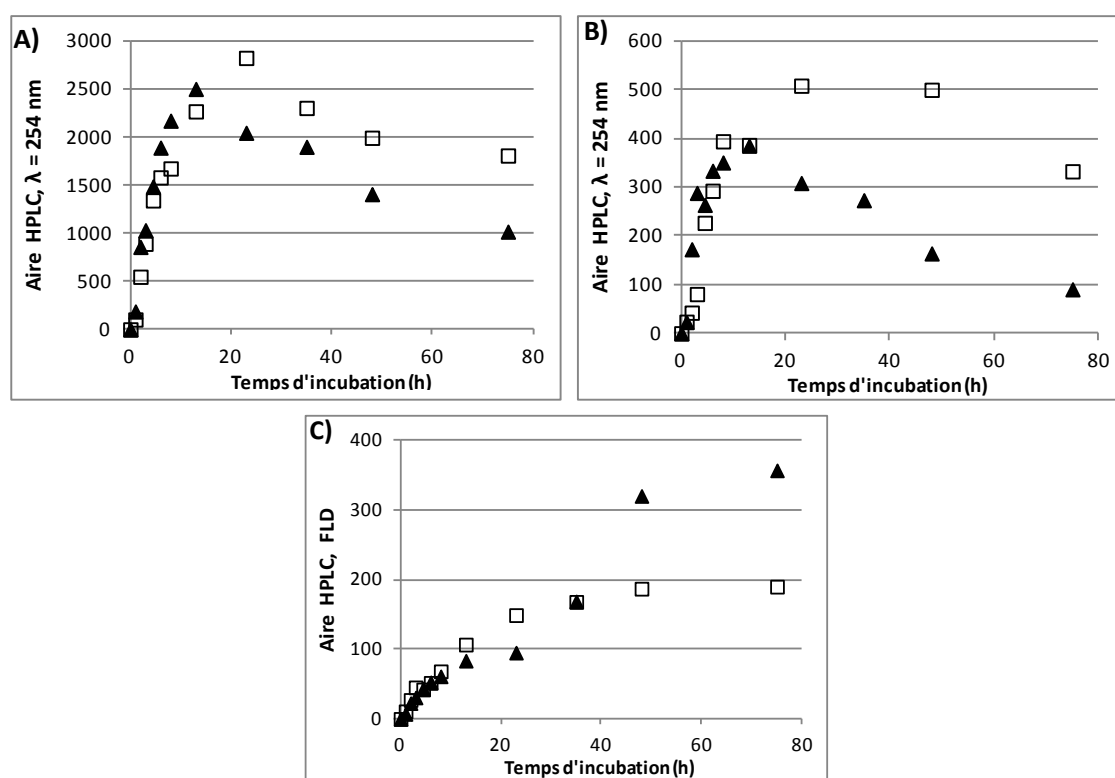


Figure 157 : Influence de la présence du tébuconazole (75 µM) sur la cinétique d'apparition des métabolites M2 (A), M3 (B) et AMBA (C) lors de la biodégradation de la mésotrione (250 µM) par la souche *Bacillus* sp. IB10. Mésotrione seule (▲), Mésotrione mélange (□)

Les concentrations des deux métabolites **M1** et **M2** de la mésotrione atteignent des maxima plus importants en présence de tébuconazole, ce qui est logique, le taux de dégradation étant plus important. A partir de 23h d'incubation, la vitesse de disparition des deux métabolites est plus lente dans le cas du mélange (en particulier **M3**) et leurs concentrations restent importantes jusqu'à 75h. Quant à l'**AMBA**, sa concentration reste plus faible, ce qui est aussi attendu, puisqu'il vient principalement de la dégradation des deux métabolites **M2** et **M3**.

L'effet du tébuconazole est donc significatif sur l'ensemble du métabolisme biodégradatif de la mésotrione par la souche *Bacillus* sp. IB10, bien qu'il ne soit pas dégradé dans le mélange.

Pour les formulations, la dégradation du Callisto® 250 µM est légèrement plus faible que celle de la matière active pure avec 78% de transformation, et toujours une cinétique en deux étapes. En présence de tébuconazole formulé, un plateau est très rapidement observé à partir de 8h d'incubation (Figure 158), correspondant à 55% de dégradation. Ce résultat peut être expliqué par la toxicité des formulations, notamment sur les souches de *Bacillus* sp.

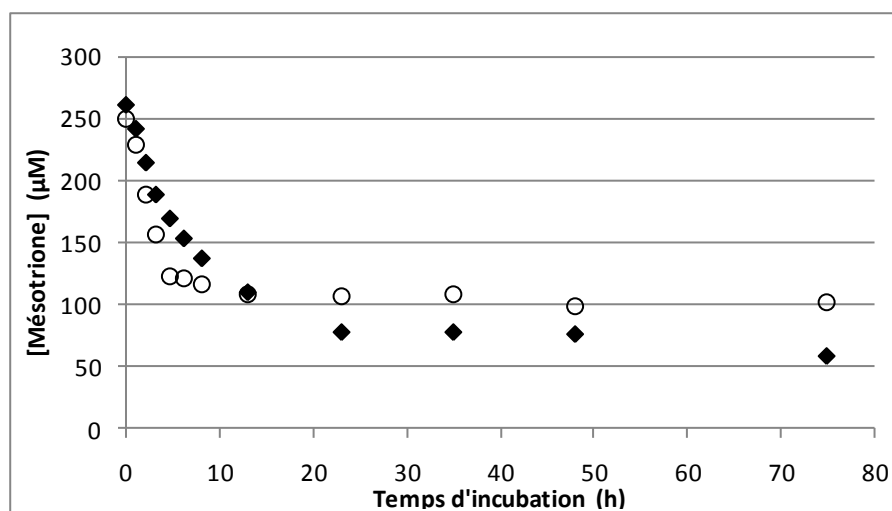


Figure 158 : Influence de la présence du Balmora® (tébuconazole = 75 µM) sur la biodégradation du Callisto® (mésotrione = 250 µM) par la souche *Bacillus* sp. IB10. Callisto® seul (◆), Callisto® mélange (○)

Notons que l'inhibition relative de la dégradation de la mésotrione formulée en présence du mélange influe sur l'apparition des trois métabolites, **M2**, **M3** et **AMBA** qui sont moins concentrés (Figure 159). D'autre part, si la dégradation du Balmora® observée est plus

rapide dans les 8 premières heures, ce décalage n'est pas retrouvé pour les métabolites **M2** et l'**AMBA**, ce qui pourrait mettre en évidence l'activation d'une autre voie métabolique.

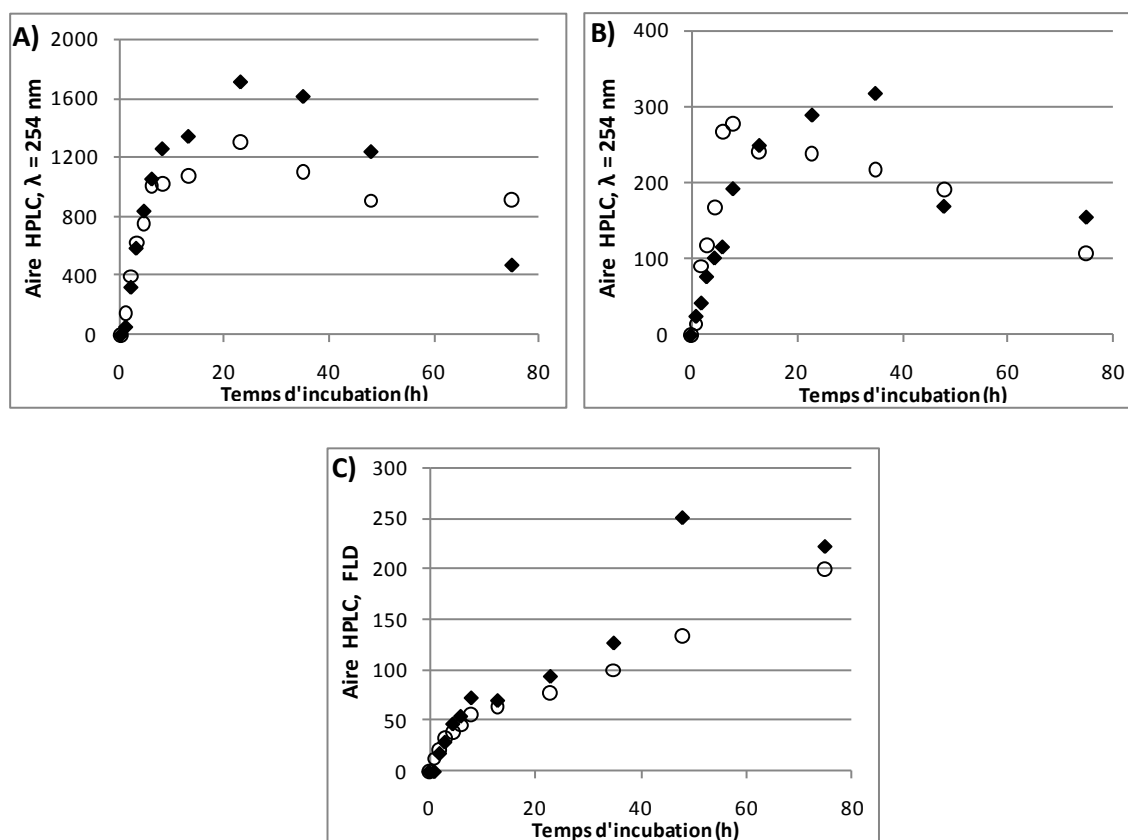


Figure 159 : Influence de la présence de Balmora® (tébuconazole = 75 µM) sur la cinétique d'apparition des métabolites M2 (A), M3 (B) et AMBA (C) lors de la biodégradation du Callisto® (mésotrione = 250 µM) par la souche *Bacillus sp. IB10*. Callisto® seul (◆), Callisto® mélange (○)

Les résultats observés sont relativement similaires à ceux obtenus avec *Bacillus sp. 3B6*.

II.2. Effet du mélange sur la biodégradation des deux pesticides par *Bacillus sp. IB11*

Le protocole utilisé est le même que précédemment (200 mL de culture bactérienne, 250 µM de mésotrione et 75 µM du tébuconazole, tests des molécules pures ou formulées, seules ou en mélange).

Pour les matières actives, le mélange influe sur la cinétique de dégradation de la mésotrione 250 µM en la ralentissant durant les premières 12h d'incubation. Par contre, la biodégradation de la mésotrione seule s'arrête au bout de 23h d'incubation atteignant un taux de 88% tandis qu'en mélange avec le tébuconazole, la dégradation se poursuit jusqu'à un taux de dégradation plus important de 98,5% au bout de 72h (Figure 160).

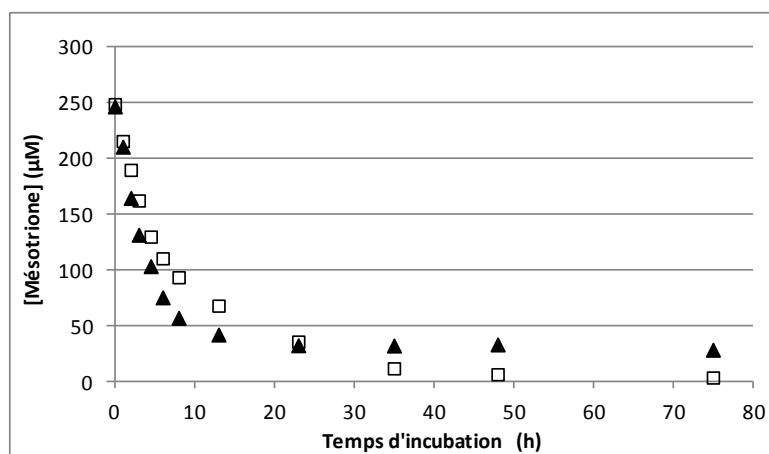


Figure 160 : Influence de la présence du tébuconazole (75 µM) sur la biodégradation de la mésotrione (250 µM) par la souche *Bacillus* sp. IB11. Mésotrione seule (▲), Mésotrione mélange (□)

La présence de tébuconazole dans le milieu affecte également les cinétiques d'apparition et de disparition des métabolites de la mésotrione (Figure 161). Ainsi M2 et M3 (Figures 161A et B) sont plus concentrés avec une nette différence entre 10 et 72h d'incubation.

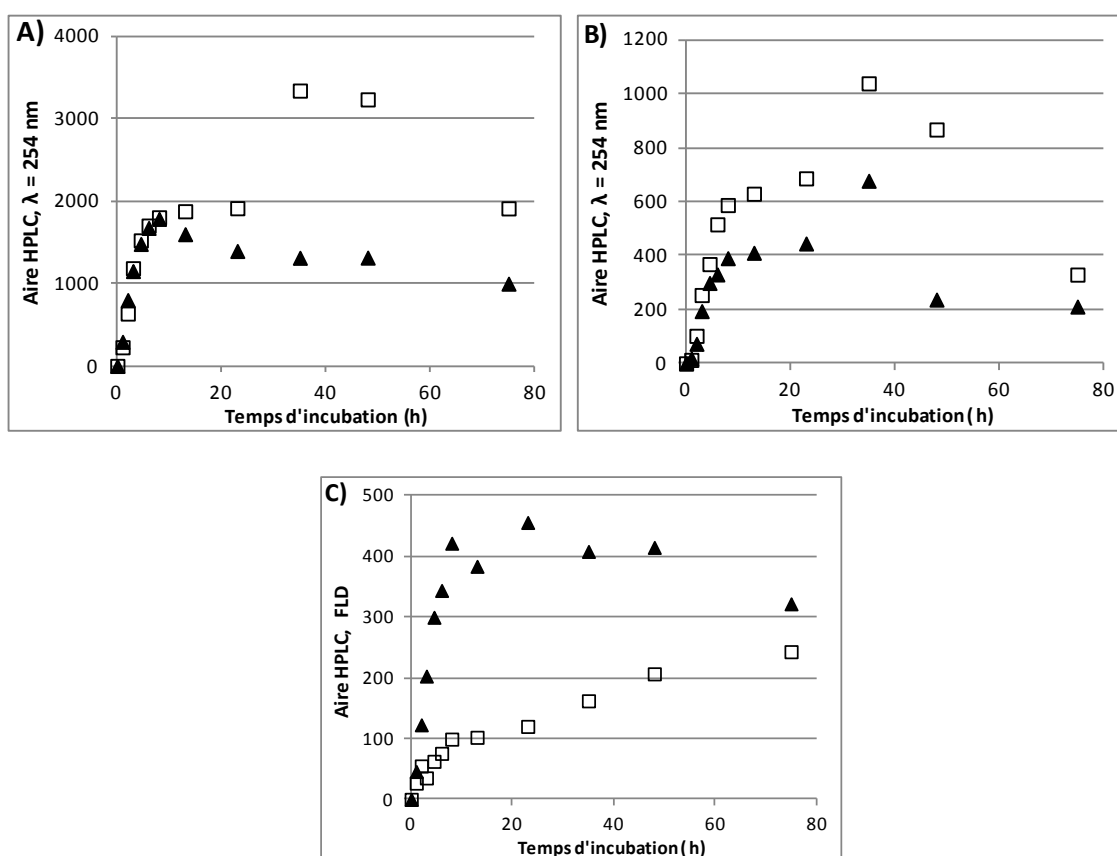


Figure 161 : Influence de la présence du tébuconazole (75 µM) sur la cinétique d'apparition des métabolites M2(A), M3 (B) et AMBA (C) lors de la biodégradation de la mésotrione (250 µM) par la souche *Bacillus* sp. IB11. Mésotrione seule (▲), Mésotrione mélange (□)

Par contre, l'**AMBA**, métabolite terminal de la mésotrione, est moins concentré en présence du mélange (Figure 161C), mais sa concentration ne cesse d'augmenter jusqu'à la fin de l'incubation, contrairement au cas de la matière active seule. Rappelons que l'**AMBA** vient principalement des deux métabolites **M2** et **M3** et que formés en plus grande quantité, il faut plus de temps pour les transformer en **AMBA**.

Pour les pesticides en formulations, la souche *Bacillus* sp. IB11 présente un comportement très différent de celui observé précédemment avec *Bacillus* sp. 3B6 et IB10. La présence du Balmora  inhibe très fortement la dégradation de la mésotrione formulée avec 20% de biodégradation contre 80% avec le Callisto  seul (Figure 162).

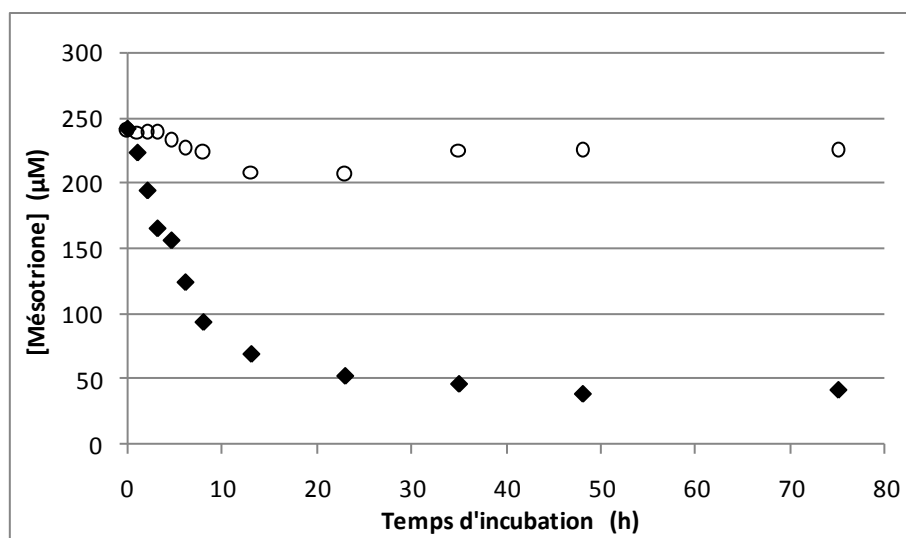


Figure 162 : Influence de la présence du Balmora  (tébuconazole = 75  M) sur la biodégradation du Callisto  (mésotrione = 250  M) par la souche *Bacillus* sp. IB11. Callisto  seul ( ), Callisto  mélange ( )

Le tébuconazole formulé à 75  M peut être particulièrement toxique pour les cellules bactériennes de cette souche. L'inhibition de la biodégradation est corrélée logiquement avec une forte inhibition de l'apparition des métabolites (Figure 163).

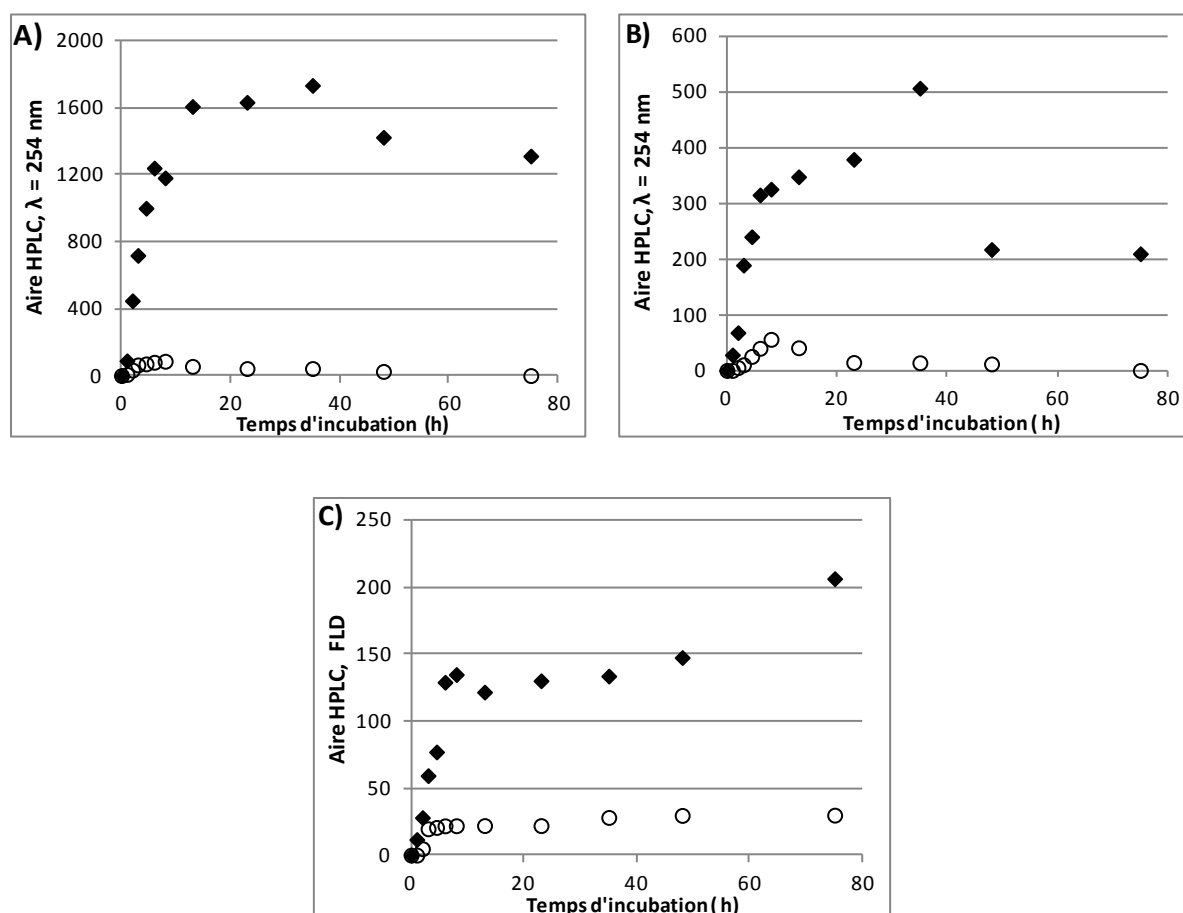


Figure 163 : Influence de la présence de Balmora® (tébuconazole = 75 µM) sur la cinétique d'apparition des métabolites M2 (A), M3 (B) et AMBA (C) lors de la biodégradation du Callisto® (mésotrione = 250 µM) par la souche *Bacillus sp.* IB11. Callisto® seul (◆), Callisto® mélange (○)

II.3. Effet du mélange sur la biodégradation des deux pesticides par *E. coli* ATCC 11303

Le comportement d'une dernière souche, Gram négatif cette fois, a été testé avec *E. coli* ATCC 11303. Elle s'est révélée moins efficace dans les tests de biodégradation de la mésotrione pure 1 mM avec un taux de dégradation ne dépassant pas 50% avec une biomasse importante. Pourtant, la particularité de cette souche est qu'elle a dégradé plus efficacement la mésotrione formulée avec un taux de dégradation allant jusqu'à 90%. Nous avons donc répété les mêmes expériences en travaillant cependant avec une biomasse deux fois plus importante que précédemment (correspondant à 400 mL de culture) pour tenter d'obtenir un taux de biodégradation de la mésotrione pure relativement important.

La mésotrione 250 μM seule est biotransformée   44% après 48h d'incubation puis la biodégradation s'arrête et atteint un plateau (Figure 164). Par contre, en présence de tébuconazole pur, une activation très marquée de la biodégradation est observée, atteignant 100 % après 32h d'incubation.

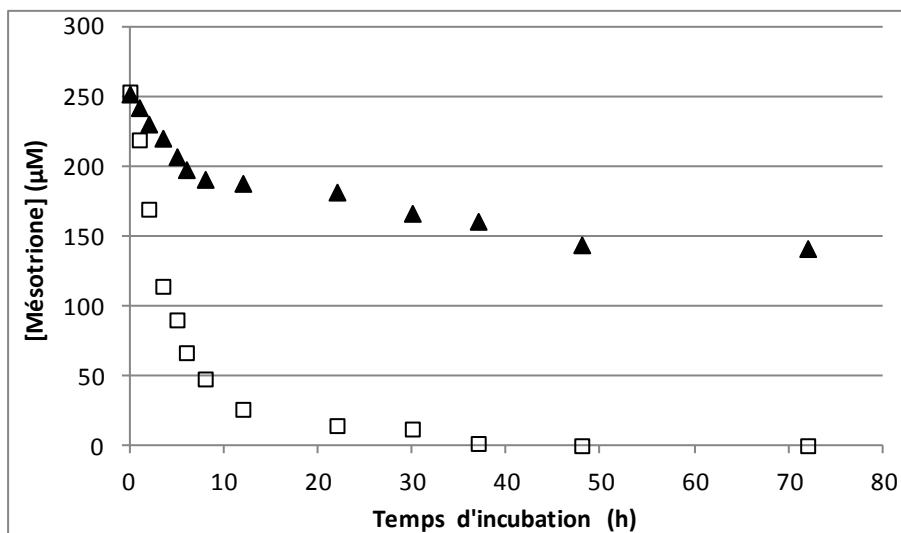


Figure 164 : Influence de la présence du tébuconazole (75 μM) sur la biodégradation de la mésotrione (250 μM) par la souche *E. coli* ATCC 11303. Mésotrione seule ( ), Mésotrione mélange ( )

Nous observons donc la même tendance qu'avec les autres souches, mais cette fois-ci, elle est particulièrement exacerbée. Malgré le fait que cette souche ne dégrade pas le tébuconazole, la présence de ce dernier stimule de manière remarquable la biodégradation de la mésotrione. Cette forte accélération conduit à la formation en concentrations beaucoup plus importantes (4 fois plus) des métabolites de la mésotrione (Figure 165). Cependant, leur biodégradation ne semble pas particulièrement activée par la présence de tébuconazole, en tout cas pendant les 72h d'incubation étudiées.

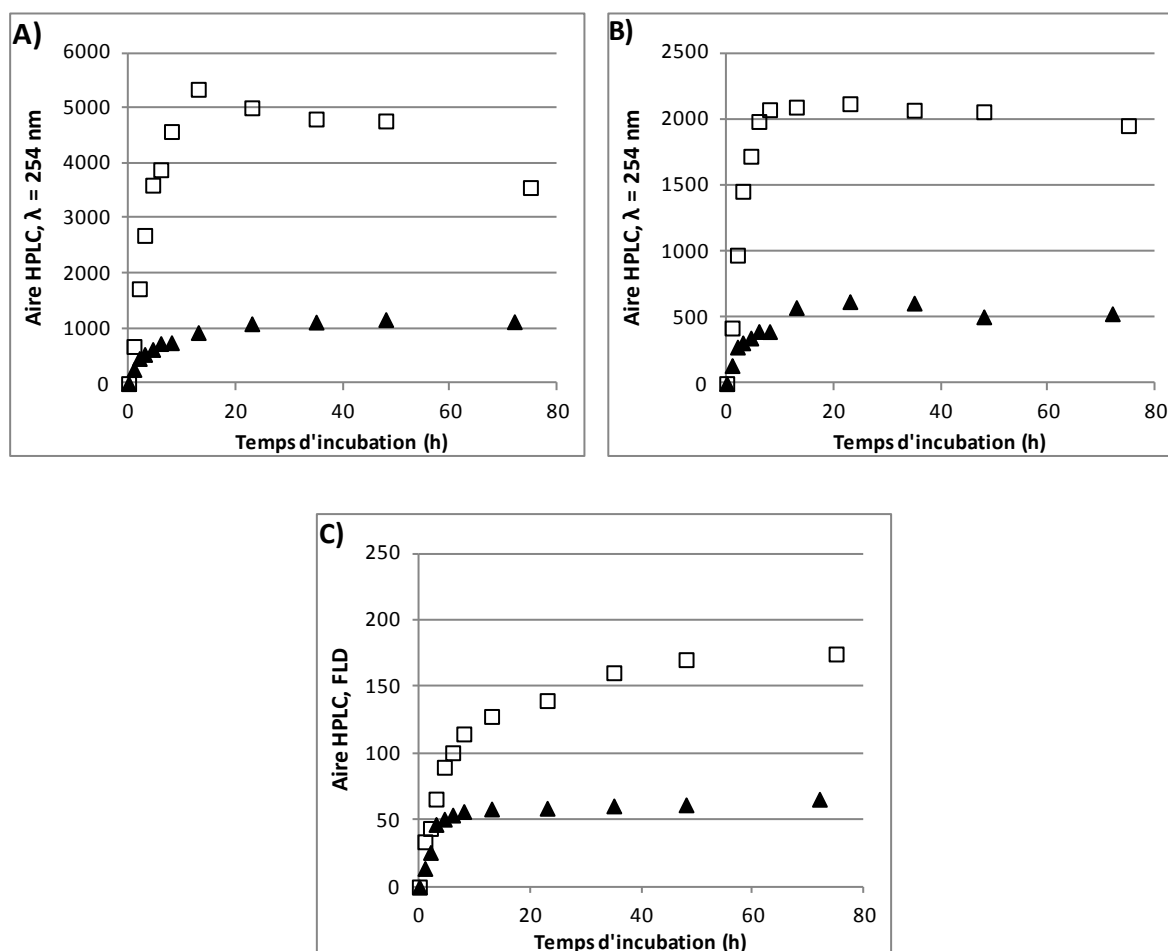


Figure 165 : Influence de la présence du tébuconazole (75 μ M) sur la cinétique d'apparition des métabolites M2 (A), M3 (B) et AMBA (C) lors de la biodégradation de la mésotrione (250 μ M) par la souche *E. coli* ATCC 11303. Mésotrione seule (▲), Mésotrione mélange (□)

Dans le cas des pesticides formulés, nous retrouvons le fait que cette souche dégrade mieux la mésotrione formulée que la matière active pure, avec dans ces conditions, un taux de biodégradation de la mésotrione 250 μ M formulée de 63% contre 44% pour la mésotrione pure. L'effet de mélange de formulations entraîne un léger effet inhibiteur et diminue le taux de biodégradation de la mésotrione formulée à 52% (Figure 166). Les adjuvants de Balmora® semblent donc avoir un impact négatif sur les cellules de la souche *E. coli* en influant sur sa capacité dégradative de la mésotrione formulée.

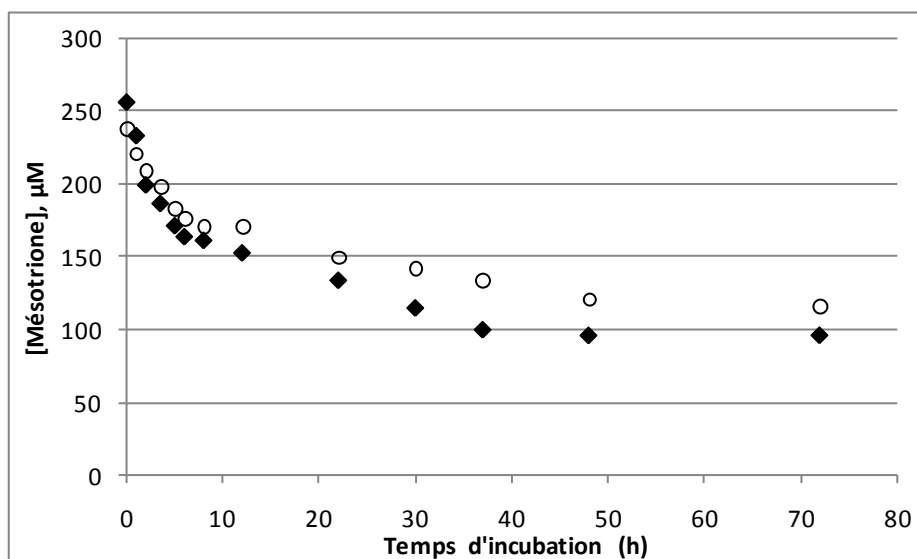


Figure 166 : Influence de la présence du Balmora® (tébuconazole = 75 µM) sur la biodégradation du Callisto® (mésotrione = 250 µM) par la souche *E. coli* ATCC 11303. Callisto® seul (◆), Callisto® mélange (○)

Notons que l'apparition des métabolites **M2**, **M3** et d'**AMBA** est également légèrement inhibée dans le cas du mélange de formulations.

II.4. Conclusions

L'impact du tébuconazole, pur ou formulé, sur la biodégradation de la mésotrione par des souches ne le dégradant pas, est très marqué : matière active seule, il accélère plus ou moins fortement la disparition de la mésotrione, d'autant plus que la souche est peu efficace; formulé, il l'inhibe de manière très significative, voire même presque complètement, dans le cas de *Bacillus* sp. IB11. Si le schéma métabolique de biodégradation de la mésotrione n'est pas changé, les métabolites se forment de manière plus importante et s'accumulent plus dans le cas de mélange purs ou formulés.

III. Etude de l'effet du mélange sur une souche bactérienne dégradant le tébuconazole mais pas la mésotrione : *Pseudomonas putida* ATCC 21224

Dans cette dernière partie, nous avons réalisé une étude complète en testant le dernier cas possible, c'est-à-dire en travaillant avec une souche dégradant le

tébuconazole mais pas la mésotrione (vérifié par des essais de biodégradation classiques mais aussi par des analyses HPLC au cours des expériences présentées ci-après). Nous avons donc étudié l'impact de la mésotrione pure et formulée sur la biodégradation du tébuconazole pur et formulé par *Pseudomonas putida* ATCC 21244 mais aussi sur sa croissance, cette souche Gram négatif s'étant montrée beaucoup plus résistante aux matières formulées seules que les souches de *Bacillus* sp.

III.1. Effet du mélange de deux pesticides sur la biodégradation du tébuconazole

Comme précédemment, le culot bactérien correspondant à 200 mL de culture est incubé en présence du tébuconazole 75 μM , pur ou formulé, seul ou en mélange avec la mésotrione 250 μM .

Les suivis cinétiques, présentés sur la Figure 167, montrent un effet significatif du mélange sur les 8 premières heures d'incubation, le temps de latence observé avec le tébuconazole seul ayant disparu. Cependant, le même effet de plateau que celui observé avec le fongicide seul est observé, conduisant à un taux de biotransformation final de 67% pour le mélange contre 53% pour le tébuconazole seul. Là encore, comme avec les souches testées avec la mésotrione, la présence d'un deuxième pesticide stimule la biodégradation du premier alors qu'il n'est pas substrat.

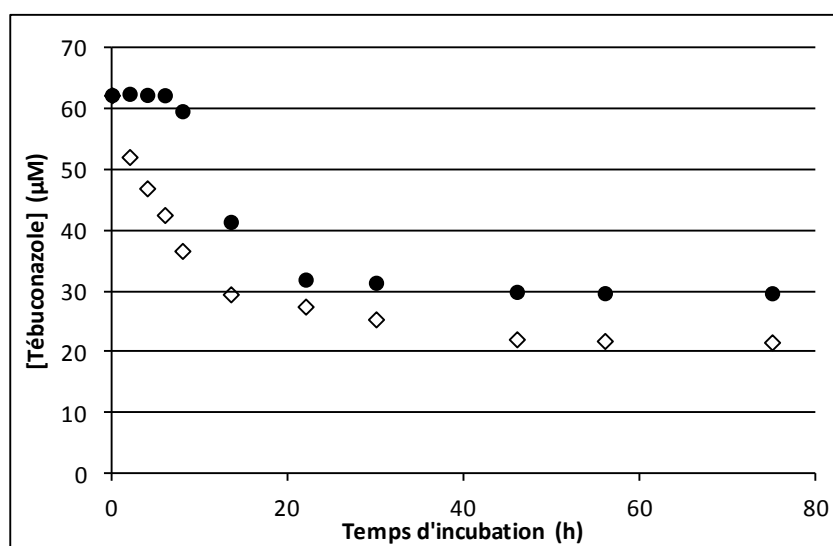


Figure 167 : Influence de la présence de mésotrione (250 μM) sur la biodégradation du tébuconazole (75 μM) par la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21224. Tébuconazole seul (●), Tébuconazole mélange (◇)

Cependant, le mélange de formulations n'a pas le même effet stimulant que celui observé avec la souche *Bacillus* sp. 3B6, et même un effet inhibiteur des adjuvants du Callisto® est noté avec cette souche de *P. putida* (Figure 168).

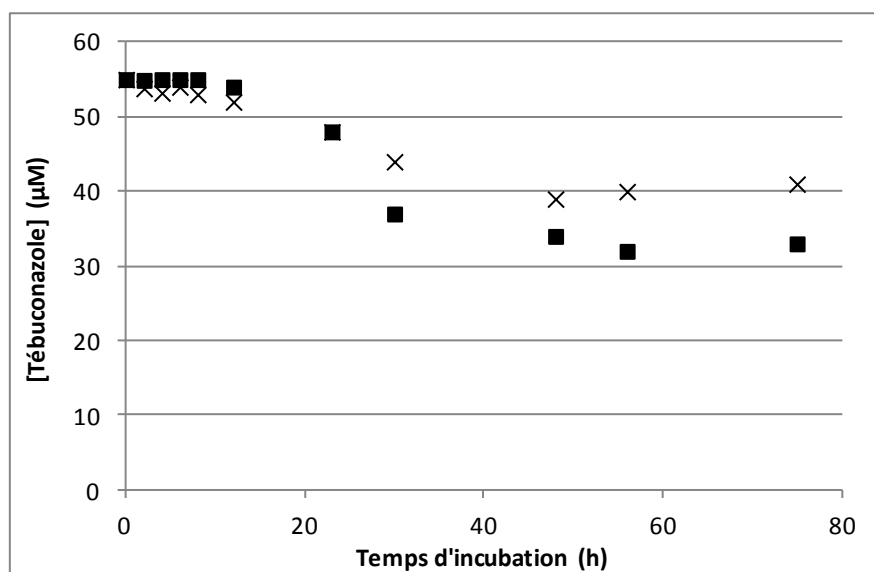


Figure 168 : Influence du Callisto® (mésotrione = 250 µM) sur la biodégradation du Balmora® (tébuconazole = 75 µM) par la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21224. Balmora® seul (■), Balmora® mélange (×)

Après un temps de latence identique, une inhibition est observée dans le cas du mélange, conduisant à un taux de biodégradation de 31% au lieu de 42 % quand le Balmora® est seul. Les adjuvants du Callisto® ne sont pas les mêmes que ceux du Balmora®, ce qui peut expliquer les réponses différentes (accélérateur ou inhibiteur) en présence d'une formulation ou l'autre.

III.2. Effet du mélange de deux pesticides sur la croissance de *Pseudomonas putida* ATCC 21244

Avec cette souche Gram négatif, qui s'était révélée plus résistante aux formulations, nous avons également réalisé quelques expériences de suivis de croissance en présence des pesticides étudiés, purs ou formulés, en mélange. Nous avons fixé la concentration en mésotrione à 250 µM, concentration qui n'a aucun effet toxique (cf. Partie 3) et avons fait varier celle en tébuconazole de 0 à 100 µM. Un essai a été conduit en absence de tout pesticide pour vérifier la viabilité de la souche (témoin).

Cette souche conserve une résistance remarquable vis-à-vis de tous les mélanges testés (Figure 169). Seule une très légère inhibition de la croissance bactérienne est observée en présence de tébuconazole 100 μM (~ 10%).

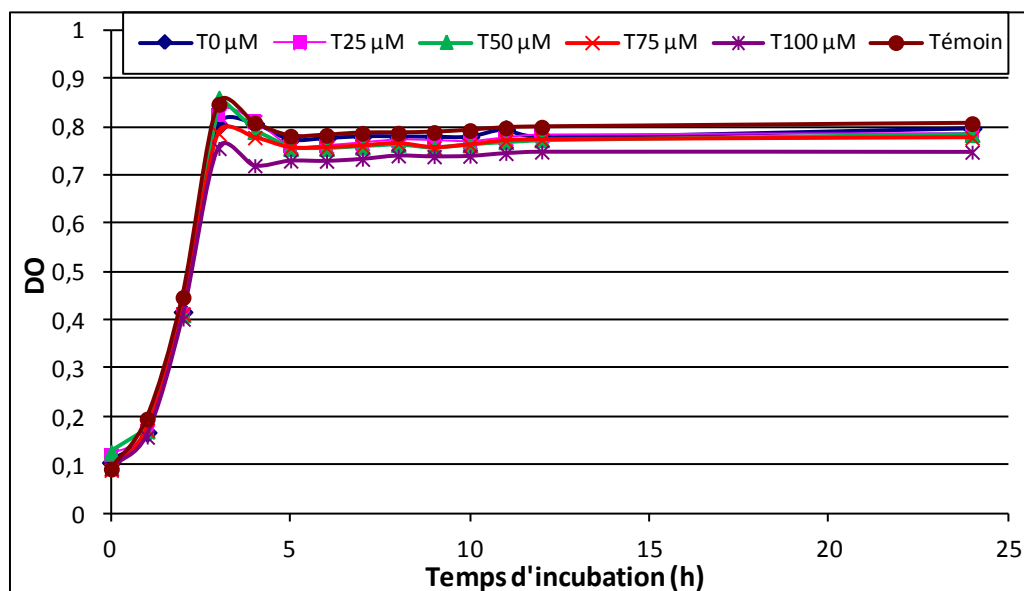


Figure 169 : Croissance de la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21224 en présence du mélange de matières actives (Mésotrione : 250 μM et concentrations variables de tébuconazole)

La vérification des concentrations en tébuconazole et mésotrione à T0 et T24h dans les mélanges a montré que le tébuconazole est dégradé à 5-6% pour toutes les concentrations et que la mésotrione, non dégradée seule, l'est à 6-7 % dans la gamme des concentrations testées et dans ces conditions.

Passons aux formulations : nous avons déjà montré dans la partie 3 que le tébuconazole formulé seul avait un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne à partir de 100 μM avec une diminution de la DO max d'environ 20%. Nous avons d'abord testé, avant de passer au mélange, l'impact de concentrations croissantes sur la mésotrione formulée. Là encore, la souche montre une grande résistance avec un effet avéré uniquement à partir de 250 μM en mésotrione formulée (Figure 170). Pour des concentrations plus faibles, un léger effet stimulant peut être noté.

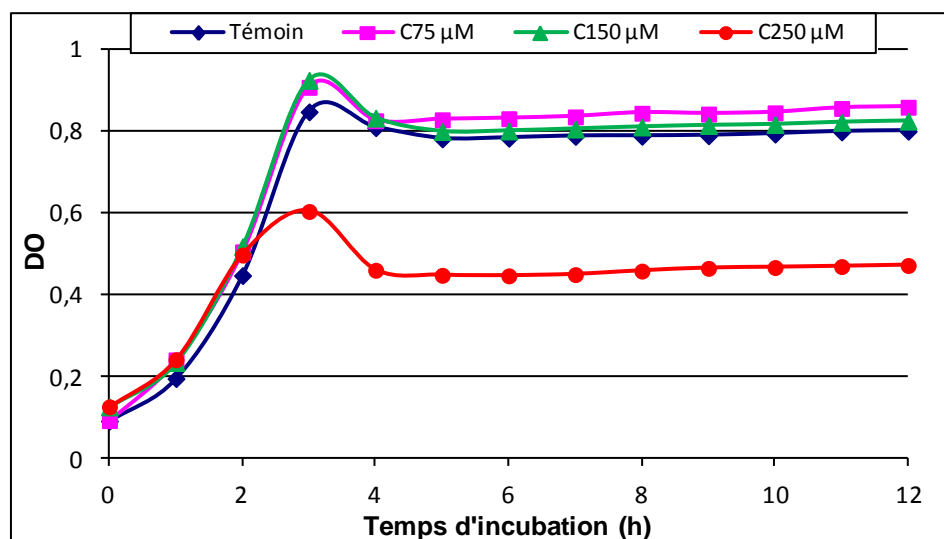


Figure 170 : Croissance de la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21224 en présence de concentrations croissantes de mésotrione formulée (Callisto®)

Nous avons donc testé différentes combinaisons de concentrations pour les deux pesticides afin d'étudier si l'effet synergique de toxicité confirmée des deux formulations vis-à-vis de la souche *Bacillus* sp. 3B6 est également valable pour *Pseudomonas putida* ATCC 21244. Nous avons fixé les trois concentrations de la mésotrione formulée à 75, 150 et 250 µM et pour chaque série, des concentrations croissantes du tébuconazole formulé (0, 30, 60 et 100 µM) sont ajoutés. Une courbe de croissance est également réalisée sans addition d'aucun pesticide, qui sert de témoin. Les résultats sont présentés sur la Figure 171.

Les courbes de croissance montrent une résistance remarquable de cette souche vis-à-vis de toutes les combinaisons testées. Ainsi, même avec le cocktail aux plus fortes concentrations (Balmora® 100 µM et Callisto® 250 µM), nous n'observons pas une inhibition totale, mais simplement une réduction de DO de 50% environ. Cependant, l'effet synergique des combinaisons est visible. Par exemple, la mésotrione formulée à 75 µM et le tébuconazole formulé à 60 µM n'ont aucun effet sur la croissance de cette souche alors que le mélange des deux inhibe de 30 % la croissance bactérienne (Figure 171A). Le même raisonnement est valable pour d'autres combinaisons comme le Callisto® 150 µM et le Balmora® 30 ou 60 µM (Figure 171B). Dans le cas des fortes concentrations : le Callisto® à 250 µM et le Balmora® à 100 µM inhibent de 30 % la croissance bactérienne et la combinaison des deux donne une inhibition de 55 %. Dans ce cas, la toxicité de ces deux formulations sur la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21224 suit le modèle d'addition des concentrations des deux produits et pas celui d'addition des effets.

En résumé, le mélange des deux formulations, Callisto® et Balmora®, a un impact complexe sur la croissance de la souche *P. putida* ATCC 21244, qui dépend des concentrations respectives. Ce qui est clair est l'effet de synergie sur la toxicité de ce mélange de pesticides formulés.

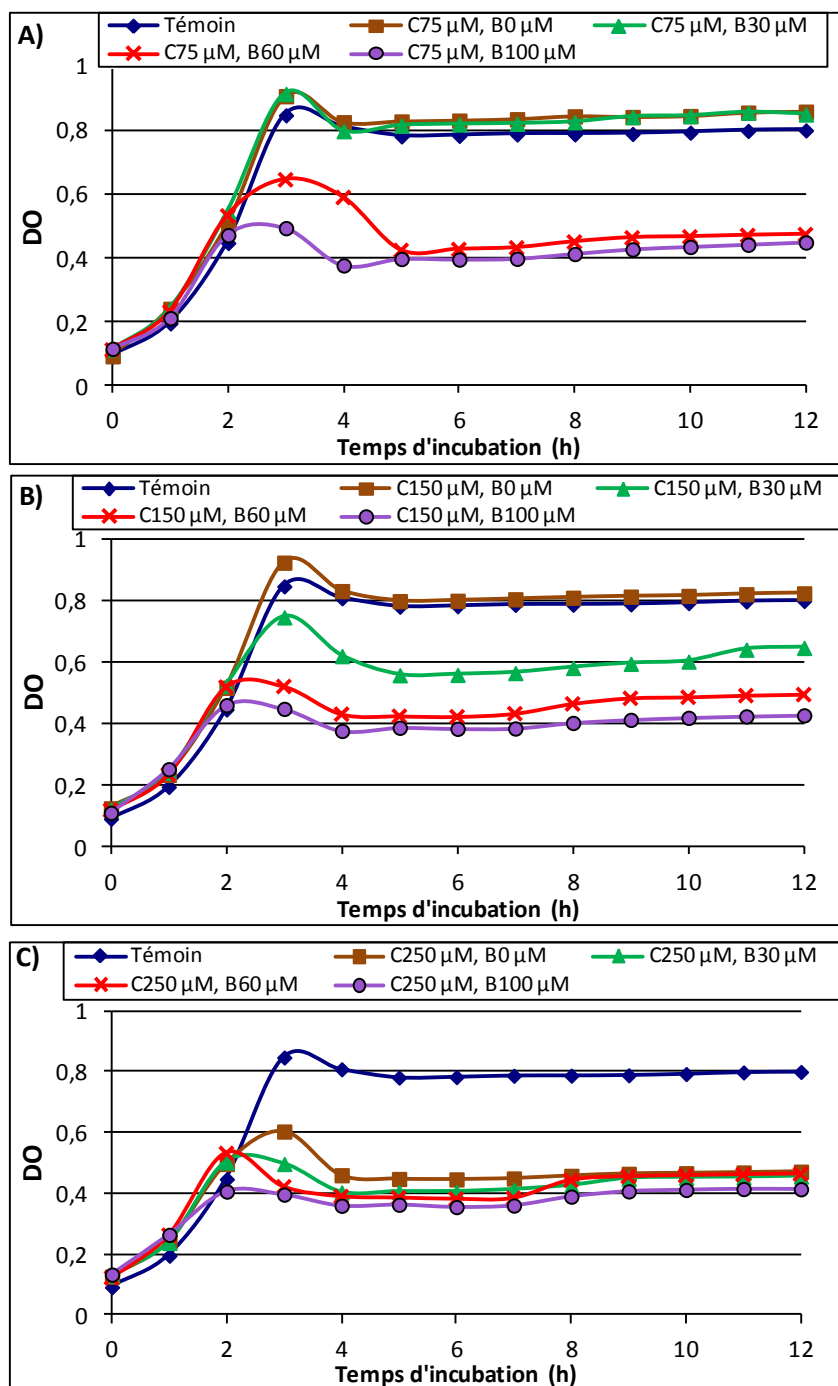


Figure 171 : Courbes de croissance de la souche *Pseudomonas putida* ATCC 21244 en présence de mélanges à différentes concentrations de mésotrione formulée (Callisto® = C) et de tébuconazole formulé (Balmora® = B)

IV. Conclusions

Nos résultats ont montré que dans le mélange (mésotrione + tébuconazole) purs, la biodégradation de chaque pesticide individuellement est soit non affectée, soit stimulée par la présence de l'autre, qu'il s'agisse de souches dégradant les deux matières actives ou de celles n'en dégradant qu'une seule. Par contre, dans le cas du mélange des formulations (Callisto® + Balmora®), la biotransformation du tébuconazole est favorisée mais celle de la mésotrione est inhibée de façon plus ou moins significative. En ce qui concerne l'inhibition de croissance (toxicité), nous avons pu mettre en évidence un effet synergique du mélange des pesticides, purs ou formulés, conduisant à des inhibitions fortes voire totales de la croissance des bactéries étudiées.

Comme décrit dans notre partie bibliographique, peu d'études comparant la biodégradation de pesticides seuls ou en mélanges ont été réalisées en milieu liquide, eau ou milieu de culture, et la plupart utilise des pesticides formulés. En élargissant aux autres compartiments environnementaux, les données bibliographiques concernant l'effet de mélange des pesticides sur la biodégradation de chacun d'entre eux montrent tous les cas de figure : accélération, aucun effet et plus souvent, ralentissement voire inhibition.

Par rapport aux pesticides étudiés ici, l'inhibition plus ou moins prononcée suivant les souches testées, de la dégradation de la mésotrione formulée (Callisto®) en présence du Balmora® est en accord avec les résultats de Joly *et al.* [2012], qui ont montré que la combinaison du Callisto® avec le *S*-métolachlore formulé (Dual Gold®) augmente sa demie-vie dans le sol de 28 à 40 jours. Malgré des conditions d'expérience complètement différentes, White *et al.* [2010] ont, eux, montré que la présence du tébuconazole formulé accélère la dégradation de l'herbicide métolachlore dans le sol en diminuant sa demie-vie de 56 à 45 jours. Nous observons également un effet stimulant du tébuconazole formulé sur le Callisto® avec la souche *E. coli*.

Si les effets inhibiteurs peuvent faire l'objet d'hypothèses (compétition de substrats pour les enzymes dégradantes, moins de microorganismes spécifiques pour un substrat donné, toxicité de l'autre molécule mère ou métabolites vis-à-vis de microorganismes dégradant le premier...), les effets stimulants sont plus difficiles à expliquer, notamment dans le cas des molécules pures. En effet, la présence d'autres sources de carbone (adjuvants) pour les formulations peut justifier d'un co-métabolisme actif conduisant à favoriser la biodégradation.

Nous pouvons également penser à une amélioration de la pénétration du pesticide dans la cellule du fait des adjuvants conduisant à une cinétique améliorée. Les résultats obtenus avec les trois souches dégradant la mésotrione mais ne dégradant pas le tébuconazole, qui montrent un effet boostant significatif voire très important (avec *E. coli*) de cette biodégradation, sont plus difficiles à expliquer. Il faudrait tester d'autres pesticides de la famille des triazoles, mais aussi d'autres familles chimiques pour voir si cet effet peut être généralisé. On peut supposer soit l'existence d'un effet inducteur sur des enzymes impliquées dans d'autres voies métaboliques en amont ou en aval, même si aucun nouveau métabolite n'a été mis en évidence dans le surnageant ; soit la mise en place de régulations des voies métaboliques impliquées par des effets complexes (inhibition/activation) à différents niveaux. Des études plus approfondies, en particulier de métabolomique pourraient permettre de valider une de ces hypothèses.

En termes de toxicité, l'effet général synergique observé a été décrit assez souvent dans la littérature, même si ce n'est que rarement avec des microorganismes. Fernandez-Alba *et al.* [2001] ont utilisé les tests normalisés, Microtox® et BioTox™, basés sur les bactéries luminescentes *Vibrio fischeri* et *Photobacterium phosphoreum* respectivement, pour étudier la toxicité de mélanges de deux pesticides, le formétanate et le promocarbe. Ils ont observé des effets synergiques ou antagonistes selon les concentrations relatives des deux pesticides. Par exemple, un mélange équimolaire de formétanate et propamocarbe est nettement plus toxique que chacun des composés purs, tandis que, le mélange de 25 et 75% des deux pesticides est aussi toxique que le composé le moins toxique (formétanate), le propamocarbe étant pourtant majoritaire dans le mélange. Il n'est donc pas facile de prédire la toxicité d'un mélange de molécules.

En résumé, les données bibliographiques ne donnent pas une règle générale aboutissant à prédire la nature de l'effet de la combinaison des pesticides sur leur biodégradabilité ou leur toxicité, tous les cas de figure ayant été répertoriés. Cet effet dépend des conditions d'expérience, de la nature des pesticides testés, des concentrations relatives des pesticides en présence, ... et c'est ce que nous avons observé lors de nos expériences.

Dans notre cas, le mélange des matières actives pures, la mésotrione et le tébuconazole, a généralement plutôt augmenté les taux de biodégradation des deux herbicides; par contre, le mélange des formulations inhibe celle de la mésotrione et active celle du tébuconazole. Ainsi,

les adjuvants présents dans les formulations jouent un rôle plus complexe qu'une simple toxicité vis-à-vis des cellules bactériennes. Les schémas métaboliques n'ont pas été modifiés sous l'effet de mélanges, en termes de métabolites observés. Cependant, les cinétiques d'apparition des métabolites du tébuconazole ont été fortement modulées et pas forcément de manière corrélées avec l'effet sur la molécule mère. Une étude plus détaillée des cinétiques observées en fonction des conditions expérimentales, ou l'utilisation de métabolites synthétisés comme point de départ de la biodégradation, pourraient certainement éclairer les mécanismes impliqués. Il faut souligner l'accélération très forte de la biotransformation observée de la mésotrione dans le cas du mélange, par la seule souche Gram négatif testée : *E. coli*. L'effet de mélange de ces deux pesticides sur la croissance de microorganismes a toujours présenté un effet synergique plus ou moins important.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusion

Les objectifs de notre travail de thèse étaient (i) d'étudier le métabolisme biodégradatif de deux pesticides, la mésotrione et le tébuconazole, par différentes souches bactériennes pour mettre en place un schéma de biodégradation ; (ii) d'examiner l'influence des adjuvants présents dans les formulations commerciales sur la biodégradation des matières actives mais aussi leur impact sur la croissance de différentes souches microbiennes ; (iii) d'évaluer l'effet de mélange de ces deux pesticides, purs ou formulés, sur leur biodégradation respective et sur la croissance de divers microorganismes.

Concernant la **mésotrione**, nos études ont abouti à généraliser le schéma métabolique de biodégradation de cet herbicide, précédemment proposé par S. Durand [2007] pour *Bacillus* sp. 3B6, en testant une dizaine de souches bactériennes, Gram positif et négatif, la dégradant totalement ou partiellement (Figure 172). La voie principale identifiée a été confirmée et débute par la réduction du groupement $-\text{NO}_2$ de la mésotrione en hydroxylamine (métabolite **M2**), qui est en équilibre avec une forme cyclisée, correspondant à une addition nucléophile intramoléculaire de la fonction hydroxyle de l'hydroxylamine sur la fonction carbonyle exocyclique (métabolite **M3**). Relativement instables, **M2** et **M3** se dégradent en **AMBA**, qui est le seul métabolite s'accumulant dans le milieu. Quelques variantes ont pu être également mises en évidence : l'isoxazol-3-ol (**M3**) a également conduit, par perte d'une molécule d'eau, à l'isoxazole correspondant (métabolite **M4**) de manière transitoire pour une seule souche, *Bacillus* sp. IB4, et ne s'accumule pas comme dans le cas de *Bacillus* sp. 3B6 ; un nouveau métabolite inconnu (**Mi**) a été observé avec 4 souches, deux Gram positif et deux Gram négatif. Il pourrait s'agir d'un métabolite issu du réarrangement de l'hydroxylamine (métabolite **M2**). La structure chimique de ce métabolite reste à confirmer.

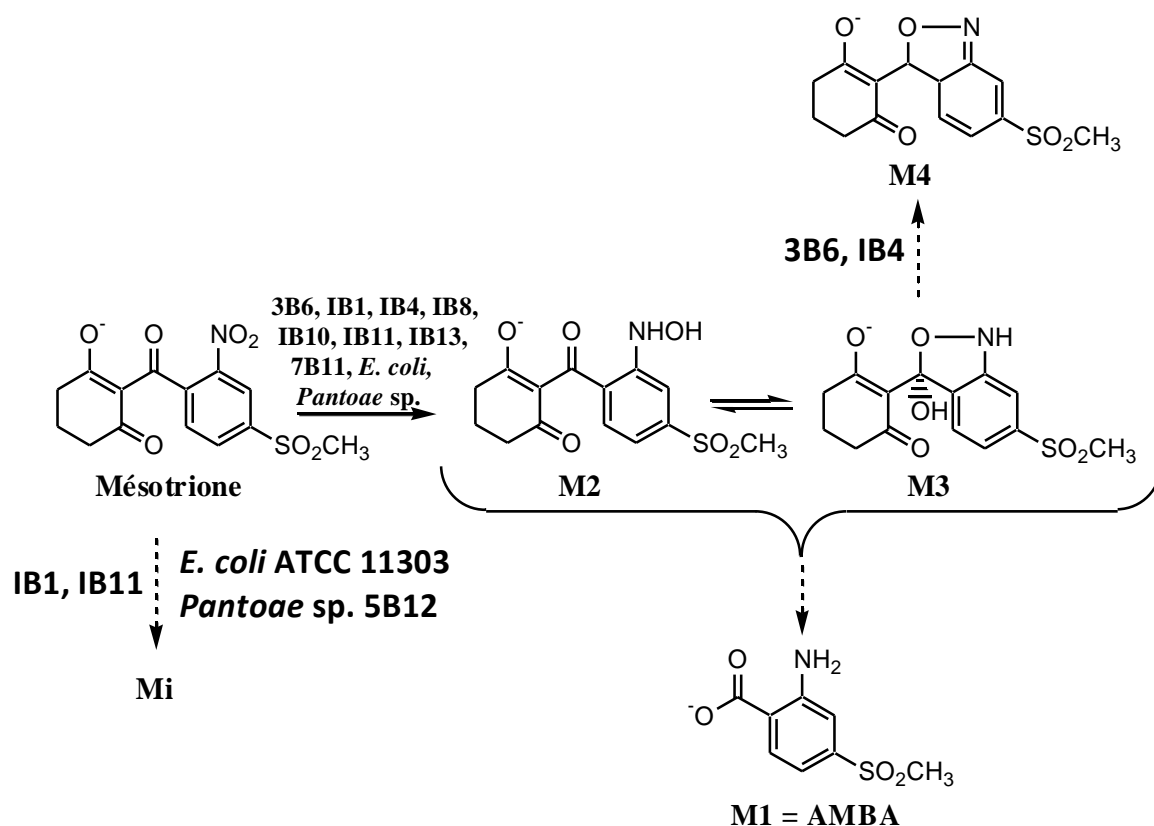


Figure 172 : Schéma métabolique proposé pour la biodégradation de la mésotrione par les souches bactériennes étudiées

L'étude comparée de la biodégradation de la mésotrione pure et formulée n'a pas montré de différence sur le schéma métabolique mais des modulations en termes de cinétiques, variables suivant le type de souches bactériennes testées. Ainsi, pour les souches Gram positif, la formulation utilisée (Callisto®) inhibe la biodégradation de la matière active, d'autant plus que la concentration est importante. Par contre, pour les souches Gram négatif, les adjuvants de cette formulation ont plutôt tendance à la stimuler, cet effet pouvant être expliqué par la capacité de ces souches à dégrader les adjuvants durant la transformation de la matière active (co-métabolisme). Cet effet est particulièrement important dans le cas de la souche *Escherichia coli* ATCC 11303.

Concernant le **tébuconazole**, un large criblage de souches (50) nous a permis de sélectionner trois souches bactériennes biotransformant le tébuconazole, avec un pourcentage de dégradation variant de 50-70% : une souche de *Bacillus* (3B6) et deux souches de *Pseudomonas*, provenant de la banque de souches ATCC. La cinétique de biodégradation par ces trois souches est indépendante de la concentration du fongicide et de la biomasse

bactérienne présente. Les méthodes analytiques complémentaires utilisées (RMN 1 et 2 D, et LC/MS/MS), nous ont permis d'identifier 3 métabolites pour *Bacillus* sp. 3B6, issus de réactions d'hydroxylation du tébuconazole et de déshydratation d'un des métabolites. En revanche, aucun métabolite n'a été détecté pour les deux souches de *Pseudomonas*, ceux-ci pouvant rester à une concentration très faible, ou être très rapidement minéralisés (Figure 173). Il faut noter que la biodégradation du tébuconazole est faiblement énantiosélective (ee = 18%) avec *Bacillus* sp. 3B6.

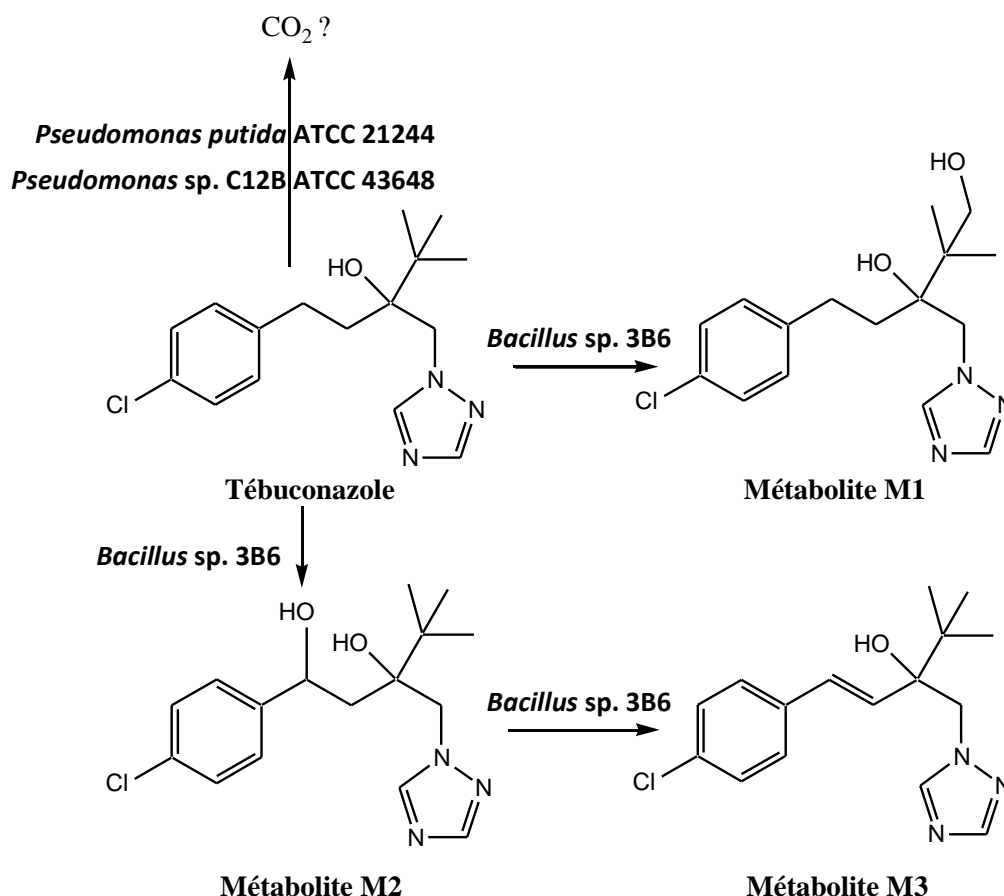


Figure 173 : Schéma métabolique proposé pour la biodégradation du tébuconazole par les souches bactériennes étudiées

La formulation testée est le Balmora®. Là encore, les effets modulateurs des adjuvants sur la cinétique de biodégradation du tébuconazole sont variables suivant la souche testée : inhibition partielle de la dégradation de la matière active à partir d'une concentration de 100 μM ou stimulation liée à la biodégradation des adjuvants (co-métabolisme).

L'impact des deux matières actives, mésotrione et tébuconazole, et des adjuvants présents dans leur formulation respective, Callisto® et Balmora®, sur la **croissance** de

différentes souches microbiennes, bactéries Gram positif et Gram négatif et levure, a également été évalué. Si la mésotrione pure n'a pas d'effets significatifs sur la croissance de tous les microorganismes testés dans une gamme de concentrations allant jusqu'à 1 mM, le tébuconazole a, lui, un effet inhibiteur plus ou moins marqué sur la croissance de ces microorganismes, notamment sur les bactéries Gram positif, bien que ces microorganismes ne soient pas des cibles du tébuconazole, anti-fongique. Les formulations ne font qu'exacerber les effets inhibiteurs observés avec en particulier des inhibitions totales de la croissance des souches bactériennes Gram positif et d'une souche eucaryote (*Candida albicans*) pour le Callisto® dès une concentration de 50 µM. Les souches Gram négatif testées se sont toujours révélées beaucoup plus résistantes vis-à-vis des adjuvants de ces deux formulations, aucune inhibition complète n'ayant été observée, même avec de très fortes concentrations en Callisto® (1 mM en matière active) (Tableau 30).

Tableau 30 : Récapitulatif des résultats d'inhibition de la croissance bactérienne et du taux de biodégradation pour la mésotrione (125 µM) et le tébuconazole (50 µM) purs (P) et formulés (F).
- : absence d'inhibition, + : faible inhibition (≤ 15 %), ++ : inhibition modérée (15-70%) et +++ : forte inhibition (> 70%)

Souches testées	Mésotrione				Tébuconazole			
	Croissance		Biodégradation		Croissance		Biodégradation	
	P	F	P	F	P	F	P	F
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	-	+++	23%	8%	+	++	15%	3%
<i>Bacillus</i> sp. IB11	+	++	82%	54%	non étudiée		non étudiée	
<i>Bacillus</i> sp. IB4	+	++	80%	36%	+	++	non dégradante	
<i>Bacillus</i> sp. 7B11	-	++	72%	78%	non étudiée		non étudiée	
<i>E. coli</i> ATCC 11303	(activation)	+	92%	70%	-	-	non dégradante	
<i>P. putida</i> ATCC 21244	non étudiée		non étudiée		-	-	3%	3%
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 17504	-	-	7%	6%	-	-	non dégradante	
<i>Candida albicans</i> CIP 444	-	++	non dégradante		+	++	non dégradante	

Après avoir étudié chaque pesticide seul, l'étude de l'influence du **mélange** des deux, matières actives ou formulations, sur leurs cinétiques de dégradation a été réalisée. Nous nous sommes également intéressés à l'impact d'une telle combinaison sur la croissance de deux modèles de souches bactériennes, une Gram positif et une autre Gram négatif. Différentes souches, dégradant l'un, l'autre ou les deux pesticides ont été choisies. La présence de l'un des deux pesticides purs module la biodégradation de l'autre pour toutes les souches testées qu'elles dégradent les deux matières actives ou une seule, en termes de cinétique et de taux

final de biodégradation. Par contre, le mélange des formulations favorise la biotransformation du tébuconazole mais inhibe de façon plus ou moins significative celle de la mésotrione (Tableau 31). Des effets complexes activation/inhibition et de régulation semblent donc être mis en place par les microorganismes vis-à-vis de ces mélanges de pesticides. Des effets sur les cinétiques d'apparition et de disparition des métabolites ont également été mis en évidence, qui pourraient suggérer la mise en place ou l'activation d'autres voies métaboliques, même si aucun nouveau métabolite n'a pu être observé dans nos conditions. La toxicité des mélanges de deux pesticides est synergique et plus grande que l'addition des toxicités de chacun des pesticides seul sur l'ensemble des souches testées, et ce qu'il s'agisse des formulations ou des matières actives.

Tableau 31 : Récapitulatif des effets du mélange de la mésotrione (250 μ M) et du tébuconazole (75 μ M) purs (P) et formulés (F) sur le taux de biodégradation de chacun d'eux seul

Souches testées	Mésotrione		Tébuconazole	
	P	F	P	F
<i>Bacillus</i> sp. 3B6	26%	Pas d'effet	Pas d'effet	18%
<i>Bacillus</i> sp. IB10	11%	-23%	non dégradante	
<i>Bacillus</i> sp. IB11	10,5%	-60%	non dégradante	
<i>E. coli</i> ATCC 11303	66%	-11%	non dégradante	
<i>P. putida</i> ATCC 21244	non dégradante		14%	-11%

Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc pu mettre en évidence :

* l'impact des adjuvants présents dans les formulations sur la biodégradation des matières actives de pesticides, celui-ci pouvant être positif (apport d'autres sources de carbone entraînant une stimulation de la biodégradation du pesticide) mais plus généralement négatif (inhibition de la biodégradation et de la croissance microbienne pouvant être totale). Il est donc très important de discriminer l'effet de la matière active de celui des adjuvants, la difficulté résidant dans le fait qu'on ne connaît pas l'ensemble des adjuvants présents dans telle ou telle formulation ;

* l'importance des mélanges de pesticides dans un milieu sur leur biodégradation et leur toxicité, chaque composé (matière active et adjuvants d'un phytosanitaire) pouvant interagir avec les autres composés (matières actives et adjuvants). Les effets sont alors

relativement complexes car ils peuvent être physico-chimiques (augmentation de solubilité liée à la présence d'autres types d'adjuvants, modifications des propriétés de sorption) mais aussi biologiques (compétition de substrats, effets toxiques d'adjuvants ou de métabolites). Malgré ces difficultés, les études devront se porter de plus en plus vers ce type d'approche, les pratiques agricoles évoluant dans le sens d'épandages de cocktails de pesticides (et de formulations !) afin de mieux comprendre le devenir des pesticides dans l'environnement. L'impact de ces mélanges sur la microflore des sols traités sera également à prendre en compte car ils peuvent entraîner des déséquilibres des communautés microbiennes édaphiques, acteurs primordiaux dans la fertilité d'un sol.

L'ensemble de ces résultats nous ouvre de nombreuses perspectives à court et plus long terme.

Perspectives

Les perspectives envisagées pour compléter ce travail de thèse concernent les quatre grandes parties présentées : la biodégradation de la mésotrione et du tébuconazole, l'impact de la matière active et de la formulation sur la croissance des microorganismes, et enfin l'impact de mélanges des deux pesticides sur leur biodégradation et leur toxicité.

Pour la partie **mésotrione**, il est important d'identifier sans ambiguïté la structure du métabolite inconnu afin de compléter le schéma métabolique de biodégradation de cet herbicide. Des modifications de conditions pour les analyses par LC/MS (mode négatif, tension d'ionisation) par RMN (autres séquences), ainsi que des analyses complémentaires par LC-RMN-MS, pourraient nous aider dans cette approche.

Concernant le **tébuconazole**, il serait intéressant de vérifier si les deux souches de *Pseudomonas* minéralisent ou non ce fongicide. Une expérience avec du tébuconazole marqué au ^{14}C pourrait permettre de mieux suivre son devenir. Des études de toxicité sur les métabolites formés pourront être également envisagées par des tests normalisés comme le Microtox®. L'isolement de souches bactériennes ou fongiques par des techniques d'enrichissement capables de biodégrader complètement le tébuconazole peut être envisagé. Cependant, il ne faut pas oublier la grande persistance du tébuconazole dans les différents compartiments de l'environnement, ce qui peut expliquer la difficulté à isoler de telles souches. Enfin, il serait intéressant de comprendre le mode d'action de ce fongicide sur des cellules bactériennes non ciblées. Il pourrait s'agir d'une action spécifique sur certains cytochromes P-450 comme observé chez les mammifères [Loose *et al.*, 1983 ; Zarn *et al.*, 2003].

Qu'il s'agisse d'une matière active ou de l'autre, le suivi systématique du **devenir des adjuvants** avec les différentes souches testées devra être réalisé. L'étude de la biodégradation des quelques adjuvants connus et commercialisés des formulations Callisto® et Balmora®, seuls ou dans différentes combinaisons avec la/les matière(s) active(s) pourrait permettre d'avoir des pistes pour une meilleure compréhension de l'impact de ces formulations sur la biodégradation de la matière active pure et sur la croissance ou toxicité vis-à-vis de

microorganismes. Il faut cependant souligner que le nombre d'adjuvants pouvant être très important dans une formulation, variant d'une formulation à l'autre et que la structure chimique de ces composés est confidentielle, une étude exhaustive n'est pas envisageable et une compréhension globale reste illusoire à l'heure actuelle. Cependant, différentes formulations sont commercialisées pour une matière active donnée. Des études comparant leurs impacts pour une même concentration en matière active pourraient être réalisées afin de comparer leurs risques potentiels respectifs.

Une autre approche pour compléter nos études sur l'impact de ces pesticides sur la **croissance bactérienne**, et peut-être analyser plus finement les résultats obtenus, serait de tester un certain nombre de métabolites identifiés avec les souches dégradantes, seuls ou en mélange avec la molécule mère et de suivre les effets.

Nous avons également mis en évidence la présence d'un effet stimulant ou inhibiteur du **mélange** des deux pesticides pour des concentrations données, sur la biodégradation de chacun d'eux. Il sera important pour compléter le travail d'étudier la variabilité de cet effet en modulant les rapports de concentrations de ces deux pesticides purs ou formulés et en suivant non seulement le devenir des matières actives mais aussi celui des adjuvants.

A plus long terme, différentes pistes pourront être suivies :

* afin de mieux évaluer et comprendre les impacts des pesticides, mais aussi des adjuvants, sur les mécanismes de biodégradation et sur leur toxicité, une approche de métabolomique pourrait s'avérer intéressante en apportant des informations sur les modifications éventuelles des profils métaboliques endogènes des microorganismes en présence de pesticides et/ou d'adjuvants, seuls ou en mélange, ce qui doit refléter le stress imputé au pesticide ou à celui des adjuvants de la formulation. Une telle approche a récemment été utilisée chez le rat exposé à un herbicide organophosphoré (dichlorvos) et un insecticide (deltaméthrine), seul ou en mélange à des doses subchroniques. Les analyses du sérum et des urines ont montré des dérégulations importantes, notamment au niveau du métabolisme énergétique [Wang *et al.*, 2013].

* Des études similaires pourraient être réalisées sur des cocktails de pesticides plus réalistes par rapport aux pratiques agronomiques actuelles. Ces approches auraient pour but

de se rapprocher d'études en microcosmes actuellement en cours au laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement de notre université (thèse de Pierre Joly) sur des herbicides appartenant à différentes familles chimiques, épandus sur culture de maïs de manière séquentielle mais rapprochée (méso-trione, S-métolachlore et nicosulfuron).

* Les travaux effectués au cours de cette thèse ont été réalisés en milieu aqueux. Il serait intéressant de voir si de tels effets sont également observés dans un compartiment plus hétérogène et plus complexe comme le sol, milieu récepteur primaire des épandages agricoles, ainsi que d'avoir une idée de l'impact sur les communautés microbiennes édaphiques globales ou plus spécifiques qui jouent un rôle majeur dans la fertilité des sols (cycle de l'azote).

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam, O., Badot, P.M., Degiorgi, F. and Crini, G.** (2009) Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L). *Ecotox. Environ. Safe.* **72**: 441-449.
- Adamczewski, K. and Matysiak, R.** (2006) The effects and benefits of adjuvants used with sulfonylurea herbicides. *Progress Plant Protect.* **46**: 240-246.
- Agreste Aquitaine** (2008) Enquête Pratiques Culturelles Maïs -2006. Numéro 17 (juin 2008).
- Ahemad, M. and Saghir Khan, M.** (2012a) Biotoxic impact of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing *Klebsiella* sp. isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *J. Pest. Sci.* **85**: 29-36.
- Ahemad, M. and Saghir Khan, M.** (2012b) Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere* **86**: 945-950.
- Alferness, P. and Wiebe, L.** (2002) Determination of Mesotrione residues and metabolites in crops, soil, and water by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 3926-3934.
- Aliferis, K.A., Materzok, S., Pazioutou, G.N. and Chrysai-Tokousbalides, M.** (2009) *Lemna minor* L. as a model organism for ecotoxicological studies performing ¹H NMR fingerprinting. *Chemosphere* **76**: 967-973.
- Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Faust, M., Scholze, M. and Grimme, L.H.** (2000) Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**: 2341-2347.
- Anderson, T.D. and Lydy, M.J.** (2002) Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**: 1507-1514.
- Andreu-Sánchez, O., Paraíba, L.C., Jonsson, C.M. and Carrasco, J.M.** (2012) Acute toxicity and bioconcentration of fungicide tebuconazole in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.* **27**: 109-116.
- Armel, G., Hall, G., Wilson, H. and Cullen, N.** (2005) Mesotrione plus atrazine mixtures for control of Canada thistle (*Cirsium arvense*). *Weed Sci.* **53**: 202-211.
- Arora, P.K., Sasikala, Ch. and Romana, Ch.V.** (2012) Degradation of chlorinated nitroaromatic compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**: 2265–2277.
- Artigas, J., Majerholc, J., Foulquier, A., Margoum, C., Volat, B., Neyra, M. And Pesce, S.** (2012) Effects of the fungicide tebuconazole on microbial capacities for litter breakdown in streams. *Aquat. Toxicol.* **122-123**: 197-205.
- Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Gramatica, P., Vighi, M. and Grimme, L.H.** (2004) Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 258-264.

- Barchanska, H., Rusek, M. and Szatkowska, A.** (2012) New procedures for simultaneous determination of mesotrione and atrazine in water and soil. Comparison of the degradation processes of mesotrione and atrazine. *Environ. Monit. Assess.* **184**: 321-334.
- Batisson, I., Crouzet, O., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Mangot, J.F., Mallet, C. and Bohatier, J.** (2009) Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environ. Pollut.* **157**: 1195-1201.
- Baugros, J.B., Giroud, B., Desalces, G., Grenier-Loustalot, M.F. and Cren-Olive, C.** (2008) Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples. *Anal. Chim. Acta* **607**: 191-203.
- Beaudegnies, R., Edmunds, A.J.F., Fraser, T.E.M., Hall, R.G., Hawkes, T.R., Mitchell, G., Schaetzer, J., Wendeborn, S., Wibley, J.** (2009) Herbicidal 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase inhibitors. A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 4134-4152.
- Beigel, C., Charnay, M.-P. and Barriuso, E.** (1999) Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 525-534.
- Benachour, N. and Séralini, G.-E.** (2009) Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.* **22**: 97-105.
- Bending, G.D., Rodriguez-Cruz, M.S. and Lincoln, S.D.** (2007) Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories. *Chemosphere* **69**: 82-88.
- Bensalah, N., Khodary, A. and Abdel-Wahab, A.** (2011) Kinetic and mechanistic investigations of mesotrione degradation in aqueous medium by Fenton process. *J. Haz. Mater.* **189**: 479-485.
- Béraud, J.M., Compagnon, J.M. and Kay, F.** (2001) La mésotrione : herbicide sélectif du maïs. *Phytoma La défense des végétaux* **542**: 41-44.
- Berenbaum, M.C.** (1985) The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J. Theor. Biol.* **114**: 413-431.
- Berenzen, N., Hummer, S., Liess, M. and Schulz, R.** (2003) Pesticide peak discharge from wastewater treatment plants into streams during the main period of insecticide application: ecotoxicological evaluation in comparison to runoff. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **70**: 891-897.
- Berenzen, N., Lentzen-Godding, A., Probst, M., Schulz, H. and Liess, M.** (2005) A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere* **58**: 683-691.
- Bliss, C.I.** (1939) The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* **26**: 585-615.
- Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M. and Bohatier, J.** (2008) Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental

- microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **55**: 576-583.
- Brausch, J.M. and Smith, P.N.** (2007) Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **52**: 217-221.
- Bromilow, R.H., Evans, A.A. and Nicholls, P.H.** (1999) Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 1. Laboratory incubations. *Pestic. Sci.* **55**: 1129-1134.
- Bromley-Challenor, K.C.A., Caggiano, N. and Knapp, J.S.** (2000) Bacterial growth on *N,N*-dimethylformamide: implications for the biotreatment of industrial wastewater. *J. Ind. Microbiol. Biot.* **25**: 8-16.
- Bundschuh, M., Zubrod, J.P., Kosol, S., Maltby, L., Stang, C., Duester, L. and Schulz, R.** (2011) Fungal composition on leaves explains pollutant-mediated indirect effects on amphipod feeding. *Aquat. Toxicol.* **104**: 32-37.
- Burden, R.S., Carter, G.A., Clark, T., Cooke, D.T., Croker, S.J., Deas, A.H.B., Hedden, P., James, C.S. and Lenton, J.R.** (1987) Comparative activity of the enantiomers of triadimenol and paclobutrazol as inhibitors of fungal growth and plant sterol and gibberellin biosynthesis. *Pestic. Sci.* **21**: 253-267.
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Melis, M., Pirisi, F.M., Minelli, E.V., Cabitza, F. and Cubeddu, M.** (1997) Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, pyrimethanil, and tebuconazole) from vine to wine. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2708-2710.
- Cadkova, E., Komarek, M., Kaliszova, R., Koudelkova, V., Dvorak, J. and Vanek, A.** (2012) Sorption of tebuconazole onto selected soil minerals and humic acids. *J. Environ. Sci. Heal. B* **47**: 336-342.
- Calza, P., Baudino, S., Aigotti, R., Baiocchi, C., Branca, P. and Pelizzetti, E.** (2002) High-performance liquid chromatographic/tandem mass spectrometric identification of the phototransformation products of tebuconazole on titanium dioxide. *J. Mass. Spectrom.* **37**: 566-576.
- Chaabane, H., Vuilliet, E., Calvayrac, C., Coste, C.M. and Cooper, J.F.** (2008) Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. *Pest Manag. Sci.* **64**: 86-93.
- Chaabane, H., Vuilliet, E., Joux, F., Lantoine, F., Conan, P., Cooper, J.F. and Coste, C.M.** (2007) Photodegradation of sulcotrione in various aquatic environments and toxicity of its photoproducts for some marine micro-organisms. *Water Res.* **41**: 1781-1789.
- Charnay, M.-P., Tarabelli, L., Beigel, C. and Barriuso, E.** (2000) Modifications of soil microbial activity and triticonazole biodegradation by pesticide formulation additives. *J. Environ. Qual.* **29**: 1618-1624.
- Christoph, F., Kaulfers, P.M. and Stahl-Biskup, E.** (2000) A comparative study of the *in vitro* antimicrobial activity of tea tree oils *s.l.* with special reference to the activity of β -triketones. *Planta Med.* **66**: 556-560.

- Christoph, F., Kaulfers, P.M. and Stahl-Biskup, E.** (2001) *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of β -triketones admixed to *Melaleuca* oils. *Planta Med.* **67**: 768-771.
- Chu, X., Fang, H., Pan, X., Wang, X., Shan, M., Feng, B. and Yu, Y.** (2008) Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations. *J. Environ. Sci.* **20**: 464-469.
- Clair, E., Mesnage, R., Travert, C. and Séralini, G.E.** (2012) A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells *in vitro*, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol. in Vitro* **26**: 269-279.
- Cosic, J., Jurkovic, D., Vrandecic, K. and Šimic, B.** (2006) Occurrence of *Fusarium* species isolated from winter wheat and barley grains in Croatia. Session: Microorganisms, Mycotoxins, and Other Biological Contaminants. 9th Proceeding IWCSPP **PS2-1-6118**: 123-127.
- Creech, J.E., Monaco, T.A. and Evans, J.O.** (2004) Photosynthetic and growth responses of *Zea mays* L and four weed species following post-emergence treatments with mesotrione and atrazine. *Pest Manag. Sci.* **60**: 1079-1084.
- Crouzet, O., Batisson, I., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Bardot, C., Poly, F., Bohatier, J. and Mallet, C.** (2010) Responses of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. *Soil Biol. Biochem.* **42**: 193-202.
- Crouzet, O., Wiszniowski, J., Donnadieu, F., Bonnemoy, F., Bohatier, J. and Mallet, C.** (2013) Dose-dependent effects of the herbicide mesotrione on soil cyanobacterial communities. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **64**: 23-31.
- Cycon, M., Piotrowska-Seget, Z., Kaczynska, A. and Kozdroj, J.** (2006) Microbiological characteristics of a sandy loam soil exposed to tebuconazole and λ -cyhalothrin under laboratory conditions. *Ecotoxicology* **15**: 639-646.
- D'Alelio, G.F.** U.S. patent 2,374,335 (April 24, 1945); *Chem. Abstracts* **40**: 12856 (1946).
- De Rossi, C., Bieri, R. and Riefstahl, J.** (2003) Organic pollutants in precipitation: monitoring of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in the region of Trier (Germany). *Phys. Chem. Earth* **28**: 307-314.
- Di Franco, C., Beccari, E., Santini, T., Pisaneschi, G. and Tecce, G.** (2002) Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *BMC Microbiology*, **2**: 33. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/33>)
- Dijksterhuis, J., van Doorn, T., Samson, R. and Postma, J.** (2011) Effects of seven fungicides on non-target aquatic fungi. *Water Air Soil Poll.* **222**: 421-425.
- Dubois, A. and Lacouture, L.** (2011) Bilan de présence des micropolluants dans les milieux aquatiques continentaux (2007-2009). Service de l'Observation et des Statistiques (SOeS), 60 pages.
- Durand, S.** (2007) Contribution à l'étude de la biodégradation et de la biodisponibilité dans les sols de la mésotrione et du glyphosate. Thèse de l'Université Blaise Pascal, DU 1764.

- Durand, S., Amato, P., Sancelme, M., Delort, A.-M., Combourieu, B. and Besse-Hoggan, P.** (2006a) First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. *Let. Appl. Microbiol.* **43**: 222-228.
- Durand, S., Légeret, B., Martin, A.S., Sancelme, M., Delort, A.-M., Besse-Hoggan, P. and Combourieu, B.** (2006b) Biotransformation of the triketone herbicide mesotrione by a *Bacillus* strain. Metabolite profiling using liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **20**: 2603-2613.
- Durand, S., Sancelme, M., Besse-Hoggan, P. and Combourieu, B.** (2010) Biodegradation pathway of mesotrione: Complementarities of NMR, LC–NMR and LC–MS for qualitative and quantitative metabolic profiling. *Chemosphere* **81**: 372-380.
- Dyson, J.S., Beulke, S., Brown, C.D. and Lane, M.C.G.** (2002) Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. *J. Environ. Qual.* **31**: 613-618.
- EFSA – European Food Safety Authority** (2008) Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebuconazole, **176**: 1-109.
- FAO/WHO** (1994) Joint Meeting of the FAO panel of experts on pesticide residues in food and the environment and the WHO expert group on pesticide residues. Rome, 19-28 September 1994
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M. and Grimme, L.H.** (2001). Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat. Toxicol.* **56**: 13-32.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M. and Grimme, L. H.** (2003) Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.* **63**: 43-63.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Boedeker, W., Scholze, M. and Grimme, L.H.** (2000) Predictive assessment of the aquatic toxicity of multiple chemical mixtures. *J. Environ. Qual.* **29**: 1063-1068.
- Felix, J., Doohan, D.J. and Bruins, J.** (2007) Differential vegetable crop responses to mesotrione soil residues a year after application. *Crop Prot.* **26**: 1395-1403.
- Fernández-Alba, A.R., Guil, L.H., López, G.D. and Chisti, Y.** (2001) Toxicity of pesticides in wastewater: a comparative assessment of rapid bioassays. *Anal. Chim. Acta* **426**: 289-301.
- Feron, V.J., Cassee, F.R. and Groten, J.P.** (1998) Toxicology of chemical mixtures: International perspective. *Environ. Health Persp.* **106**: 1281-1288.
- Flueckiger J.** (1995) [$1-^{14}\text{C}$] N,N-Dimethyldecanoic acid amide: Degradation in three soils incubated under aerobic conditions. RCC Umweltchemie AG, Study Project No. RCC Project 340345.

- Fogg, P., Boxall, A.B.A. and Walker, A.** (2003). Degradation of pesticides in biobeds: The effect of concentration and pesticide mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **51**: 5344-5349.
- Foy, C. and Pritchard, D.** (1996) Pesticide formulation and adjuvant technology. New York: CRC Press.
- Giesy, J.P., Dobson, S. and Solomon, K.R.** (2000) Ecotoxicological risk assessment for Roundup® Herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **167**: 35-120.
- Gledhill, A.J., Jones, B.K. and Laird, W.J.D.** (2001) Metabolism of 2-(4-methylsulphonyl-2-nitrobenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (mesotrione) in rat and mouse. *Xenobiotica* **31**: 733-747.
- Gray, R.A., Rusay, R.J. and Tseng, C.K.** (1980) 1-Hydroxy-2-(alkylketo)-4,4,6,6-tetramethyl cyclohexen-3,5-diones. US Patent, US 4202840 A 19800513.
- Grigg, B.C., Bischoff, M. and Turco, R.F.** (1997) Cocontaminant effects on degradation of triazine herbicides by a mixed microbial culture. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 995-1000.
- Grzegorz, A.S., Sobiech, L. and Waniorek, W.** (2011) Evaluation of the efficacy of Mesotrione plus Nicosulfuron with additives as tank mixtures used for weed control in maize (*Zea Mays* L.) *J. Plant Res.* **51**: 3.
- Güven, K., Togrul, S., Uyar, F., Ozant, S. and De Pomerai, D.I.** (2003) A comparative study of bioassays based on enzyme biosynthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* exposed to heavy metals and organic pesticides. *Enzyme Microb. Tech.* **32**: 658-664.
- Haigh, S.D.** (1996) A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in soils. *Sci. Total Environ.* **185**: 161-170.
- Haigler, B.E., Wallace, W.H. and Spain, J.C.** (1994) Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JS42. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3466-3469.
- Hall, M.G., Wilks, M.F., McLean Provan, W., Eksborg, S. and Lumholtz, B.** (2001) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **52**: 169-177.
- Han, Q.M., Kang, Z.S., Buchenauer, H., Huang, L.L. and Zhao, J.** (2006) Cytological and immunocytochemical studies of the effects of the fungicide tebuconazole on the interaction of wheat with stripe rust. *J. Plant Path.* **88**: 263-271.
- Harrop, A.J., Hocknult, M.D. and Lilly, M.D.** (1989) Biotransformation in organic solvents: a difference between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Biotechnol. Lett.* **11**: 807-810.

- Hausman, N.E., Singh, S., Tranel, P.J., Riechers, D.E., Kaundun, S.S., Polge, N.D., Thomas, D.A. and Hager, A.G.** (2011) Resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a population of waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Illinois, United States. *Pest. Manag. Sci.* **67**: 258-261.
- Hayyan, M., Hashim, M.A., Hayyan, A., Al-Saadi, M.A., AlNashef, I.M., Mirghani, M.E.S. and Saheed, O.K.** (2013) Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere* **90**: 2193-2195.
- Herrero-Hernandez, E., Andrades, M.S., Marin-Benito, J.M., Sanchez-Martin, M.J. and Rodriguez-Cruz, M.S.** (2011) Field-scale dissipation of tebuconazole in a vineyard soil amended with spent mushroom substrate and its potential environmental impact. *Ecotox. Environ. Safe.* **74**:1480-1488.
- Herrero-Hernandez, E., Andrades, M.S., Alvarez-Martin, A., Pose-Juan, E., Rodriguez-Cruz, M.S. and Sanchez-Martin, M.J.** (2013) Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *J. Hydrol.* **486**: 234-245.
- Hong, H.-B., Hwang, S.-H. and Chang, Y.-S.** (2000) Biosorption of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and polychlorinated dibenzofurans by *Bacillus pumilus*. *Water Res.* **34**: 349-353.
- Hou, S.C., Zhou, Z.Q., Qiao, Z., Guo, H.C., Shi, X.Y. and Wang, M.** (2003) Separation of the enantiomers of tebuconazole and its potential impurities by high-performance liquid chromatography with a cellulose derivative-based chiral stationary phase. *Chromatographia* **57**: 177-180.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K. and Veldhoen, N.** (2004) Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 1928-1938.
- Huang, M.-l., Zou, J.-W., Yang, D.-Y., Ning, B.-Z., Shang, Z.-C. and Yu, Q.-S.** (2002) Theoretical studies on tautomerism of benzoylcyclohexane-1,3-dione and its derivatives. *J. Mol. Struct- THEOCHEM* **589-590**: 321-328.
- Huber, M., Meyer, U. and Rys, P.** (2000) Biodegradation mechanisms of linear alcohol ethoxylates under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 1737-1741.
- Hugie, J.A, Bollero, G., Tranel, P.J. and Riechers, D.E.** (2008) Defining the rate requirements for synergism between mesotrione and atrazine in redroot pigweed (*Amaranthus Retroflexus*). *Weed Sci.* **56**: 265-270.
- Hussain, S., Sorensen, S.R., Devers-Lamrani, M., El-Sebai, T. and Martin-Laurent, F.** (2009) Characterization of an isoproturon mineralizing bacterial culture enriched from a French agricultural soil. *Chemosphere* **77**: 1052-1059.
- Jafvert, C.T., Westall, J.C., Grieder, E. and Schwarzenbach, R.P.** (1990) Distribution of ionogenic organic compounds between octanol and water: organic acids. *Environ. Sci. Technol.* **24**: 1795-1803.
- Jahan, K., Balzer, S. and Mosto, P.** (2008) Toxicity of nonionic surfactants. *Environ. Toxicol. II WIT Trans. Ecol. Environ.* **110**: 281-290.

- Japan Housing and Wood Technology Center (HOWTEC)** (2002) Standard of quality evaluation for the approval on high quality wooden building-materials, Tokyo.
- Joly, P., Besse-Hoggan, P., Bonnemoy, F., Batisson, I., Bohatier, J. and Mallet, C.** (2012) Impact of maize formulated herbicides, Mesotrione and S-Metolachlor, applied alone and in mixture, on soil microbial communities. *International Scholarly Research Network, ISRN Ecology*, 2012, ID 329898.
- Ju, Y.-H., Chen, T.-C. and Liu, J.** (1997) A study on the biosorption of lindane. *Colloid Surface B* **9**: 187-196.
- Kahle, M., Buerge, I.J., Hauser, A., Müller, M.D. and Poiger, T.** (2008) Azole fungicides: Occurrence and fate in wastewater and surface waters. *Environ. Sci. Technol.* **42**: 7193-7200.
- Kang, Z., Huang, L., Krieg, U., Mauler-Machnik, A. and Buchenauer, H.** (2001) Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* in vitro. *Pest Manag. Sci.* **57**: 491-500.
- Karabay, N.U. and Oguz, M.G.** (2005) Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genet. Mol. Res.* **4**: 653-662.
- Karanth, N.G.K., Anderson, J.P.E. and Domsch, K.H.** (1984) Degradation of the herbicide diclofop-methyl in soil and influence of pesticide mixtures on its persistence. *J. Biosci.* **6**: 829-837.
- Kaufman, D.D., Kearney, P.C., Von Endt, D.W. and Miller, D.E.** (1970) Methylcarbamate inhibition of phenylcarbamate metabolism in soil. *J. Agric. Food Chem.* **18**: 513-519.
- Kester, A.S. and Foster, J.W.** (1963) Diterminal oxidation of long-chain alkanes by bacteria. *J. Bacteriol.* **85**: 859-869.
- Kim, C., Lorenz, W.W., Hoopes, J.T. and Dean, J.F.D.** (2001) Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* yacK gene. *J. Bacteriol.* **183**: 4866-4875.
- Kjaerstad, M.B., Taxvig, C., Nellemann, C., Vinggaard, A.M. and Andersen, H.R.** (2010) Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reprod. Toxicol.* **30**: 573-582.
- Komarek, M., Cadkova, E., Chrastny, V., Bordas, F. and Bollinger, J.-C.** (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environ. Int.* **36**: 138-151.
- Konwick, B.J., Garrison, A.W., Avants, J.K. and Fisk, A.T.** (2006) Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **80**: 372-381.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliero, D., Martins, D., Lorenson, M., Marteninghe, A. and da Silva, L.B.** (2008) Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciência Rural, Santa Maria* **38**: 1050-1055.

- Krishna, K.R. and Philip, L.** (2011) Bioremediation of single and mixture of pesticide-contaminated soils by mixed pesticide-enriched cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**: 1257-1477.
- Kucharski, M. and Sadowski, J.** (2009) Degradation of ethofumesate in soil under laboratory conditions. *Polish J. Environ. Stud.* **18**: 243-247.
- Kucharski, M. and Sadowski, J.** (2011) Behaviour of metazachlor applied with additives in soil: Laboratory and field studies. *J. Food Agric. Environ.* **9**: 723-726.
- Kumar, N., Bora, A. and Amb, M.K** (2010) Chronic toxicity of the triazole fungicide tebuconazole on a heterocystous, nitrogen-fixing rice paddy field cyanobacterium, *Westiellopsis prolifica* Janet. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 1134-1139.
- Kupper, T., Bucheli, T.D., Brändli, R.C., Orтели, D. and Edder, P.** (2008) Dissipation of pesticides during composting and anaerobic digestion of source-separated organic waste at full-scale plants. *Bioresource Technol.* **99**: 7988-7994.
- Larochelle, J., Alvarez, F., Bussi res, J.F., Chevalier, I., Dallaire, L., Dubois, J., Faucher, F., Fenyves, D., Goodyer, P., Grenier, A., Holme, E., Laframboise, R., Lambert, M., Lindstedt, S., Maranda, B., Melan on, S., Merouani, A., Mitchell, J., Parizeault, G., Pelletier, L., Phan, V., Rinaldo, P., Scott, C.R., Scriver, C. and Mitchell G.A.** (2012) Effect of nitisinone (NTBC) treatment on the clinical course of hepatorenal tyrosinemia in Québec. *Mol. Genet. Metab.* **107**: 249-254.
- Lavieille, D., Ter Halle, A. and Richard, C.** (2008) Understanding mesotrione photochemistry when applied on leaves. *Envir. Chem.* **5**: 420-425.
- Lavieille, D., Ter Halle, A., Bussi re, P.O. and Richard, C.** (2009) Effect of a spreading adjuvant on mesotrione photolysis on wax films. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 9624-9628.
- Lebkowska, M., Zaleska-Radziwitt, M., Rutkowska-Narozniak, A. and Kobiela, S.** (2003) Toxicity assessment of wood preservatives. *Environ. Int.* **28**: 801-802.
- Lee, D.L., Knudsen, C.G., Michaely, W.J., Chin, H.-L., Nguyen, N.H., Carter, C.G., Cromartie, T.H., Lake, B.H., Shribbs, J.M. and Fraser, T.** (1998) The structure-activity relationships of the triketone class of HPPD herbicides. *Pestic. Sci.* **54**: 277-384.
- Lewis, R.W. and Botham, J.W.** (2013) A review of the mode of toxicity and relevance to humans of the triketone herbicide 2-(4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoyl)-1,3-cyclohexanedione. *Crit. Rev. Toxicol.* **43**: 185-199.
- Li, K.-B., Cheng, J.-T., Wang, X.-F., Zhou, Y. and Liu, W.-P.** (2008) Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination in soils. *Pedosphere* **18**: 265-272.
- Liang, J., Guo, Z.-Y. and Peng, X.-C.** (2009) Kinetics of tebuconazole photodegradation behavior in soil. *Chinese J. Eco-Agr.* **17**: 721-727.
- Lindstedt, S., Holme, E., Lock, E.A., Hjalmarson, O. and Strandvik, B.** (1992) Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet* **340**: 822-823.

- Linser, H. and Kiermeyer, O.** (1957) Zellphysiologische Untersuchungen über die Wirkung von 3-aminotriazol und 3-(α -iminoäthyl)-5-methyl-tetronsäure als spezifische Chlorophyll-bildungshemmstoffe bei *Elodea Canadensis*. *Planta* **49**: 498-504.
- Loose, D.S., Kan, P.B., Hirst, M.A., Marcus, R.A. and Feldman, D.** (1983) Ketoconazole blocks adrenal steroidogenesis by inhibiting P450-dependent enzymes. *J. Clin. Invest.* **71**: 1495-1499.
- Madsen, T., Petersen, G., Seiero, C. and Torslov, J.** (1996) Biodegradability and aquatic toxicity of glycoside surfactants and a nonionic alcohol ethoxylate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**: 929-933.
- Manthey, M.K., Pyne, S.G. and Truscott, J.W.** (1988) Autooxidation of 3-hydroxyanthranilic acid. *J. Org. Chem.* **53**: 1486-1488.
- Marinova, N.A. and Yankov, D.S.** (2009) Toxicity of some solvents and extractants towards *Lactobacillus casei* cells. *Bulg. Chem. Commun.* **41**: 368-373.
- Martinazzo, R., Pinheiro Dick, D., Mozael Hirsch, M., Benvenuti Leite, S. and do Carmo Ruaro Peralba, M.** (2011) Sorção de atrazina e de mesotriona em latossolos e estimativa do potencial de contaminação. *Quim. Nova* **34**: 1378-1384.
- Martins, J.M. and Mermoud, A.** (1998) Sorption and degradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturated/unsaturated soil batch systems. *J. Contam. Hydrol.* **33**: 187-210.
- Marvin-Sikkema, F.D. and de Bont, J.A.M.** (1994) Degradation of nitroaromatic compounds by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 499-507.
- Matson, R.S., Hare, R.S. and Fulco, A.J.** (1977) Characteristics of a cytochrome P-450-dependent fatty acid omega-2-hydroxylase from *Bacillus megaterium*. *Biochim. Biophys. Acta* **487**: 487-494.
- Matthies, A. and Buchenauer, H** (2000) Effect of tebuconazole (Folicur®) and prochloraz (Sportak®) treatments on *Fusarium* head scab development, yield and deoxynivalenol (DON) content in grains of wheat following artificial inoculation with *Fusarium culmorum*. *J. Plant Dis. Protect.* **107**: 33-52.
- Mayonado, D.J., Hatzios, K.K., Orcutt, D.M. and Wilson, H.P.** (1989) Evaluation of the mechanism of action of the bleaching herbicide SC-0051 by HPLC analysis. *Pestic. Biochem. Phys.* **35**: 138-145.
- Mazur, C.S., Kenneke, J.F., Tebes-Stevens, C., Okino, M.S. and Lipscomb, J.C.** (2007) *In vitro* metabolism of the fungicide and environmental contaminant *trans*-bromuconazole and implications in risk assessment. *J. Toxicol. Environ. Health* **70**: 1241-1250.
- McGurdy, J.D., McElroy, J.S., Breeden, GK and Kopsell, DA** (2008) Mesotrione plus Prodiamine for smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*) control in established Bermudagrass Turf. *Weed Technol.* **22**: 275-279.

- Menegola, E., Broccia, M.L., Di Renzo, F. and Giavini, E.** (2006) Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects. *Reprod. Toxicol.* **22**: 186-195.
- Mesnage, R., Bernay, B. and Séralini, G.-E.** (2012) Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* doi: 10.1016/j.tox.2012.09.006
- Michaely, W.J. and Kraatz, G.W.** (1988) 2-(2-substituted benzoyl)-1,3-cyclohexanediones. Eur. Pat. Appl. (35p) EPXXDW EP 135191 A2 19850325. (1988) US Patent 4,780,127.
- Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E.M., Hawkers, T.R., Holt, D.C., Towson, J.K. and Wichert, R.A.** (2001) Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Manag. Sci.* **57**: 120-128.
- Moran, G.R.** (2005) 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**: 117-128.
- Moser, V.C., Barone, S., Smialowicz, R.J., Harris, M.W., Davis, B.J., Overstreet, D., Mauney, M. and Chapin, R.E.** (2001) The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. *Toxicol. Sci.* **62**: 339-352.
- Mulla, S.I., Hoskeri, R.S., Shouche, Y.S. and Ninnekar, H.Z.** (2011) Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Micrococcus* sp. strain SMN-1. *Biodegradation* **22**: 95-102.
- Munoz-Leoz, B., Ruiz-Romera, E., Antigüedad, I. and Garbisu, C.** (2011) Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biol. Biochem.* **43**: 2176-2183.
- Murati, M., Oturan, N., Aaron, J.J., Dirany, A., Tassin, B., Zdravkovski, Z. and Oturan, M.A.** (2012) Degradation and mineralization of sulcotrione and mesotrione in aqueous medium by the electro-Fenton process: a kinetic study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **19**: 1563-1573.
- Nhi-Cong, L.T., Mikolasch, A., Awe, S., Sheikhany, H., Klenk, H.-P. and Schauer, F.** (2010) Oxidation of aliphatic, branched chain, and aromatic hydrocarbons by *Nocardia cyriacigeorgica* isolated from oil-polluted sand samples collected in the Saudi Arabian Desert. *J. Basic Microbiol.* **50**: 241-253.
- Nishino, S.F. and Spain, J.C.** (1995) Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS765. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2308-2313.
- Nobels, I., Spanoghe, P., Haesaert, G., Robbens, J. and Blust, R.** (2011) Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles. *PlosOne* **6**: e24139.
- Norgaard, K.B. and Cedergreen, N.** (2010) Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **17**: 957-967.
- Obanda, D.N. and Shupe, T.F.** (2009) Biotransformation of tebuconazole by microorganisms: Evidence of a common mechanism. *Wood Fiber Sci.* **41**: 157-167.

- Obanda, D.N., Shupe, T.F. and Catallo, W.J.** (2008) Resistance of *Trichoderma harzianum* to the biocide tebuconazol – Proposed biodegradation pathways. *Holzforschung* **62**: 613-619.
- Ogunseitan, O.A. and Olson, B.H.** (1993) Effect of 2-hydroxybenzoate on the rate of naphthalene mineralization in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 799-807.
- Onyewu, C., Blankenship, J.R., Del Poeta, M. and Heitman, J.** (2003) Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 956-964.
- Osiadacz, J., Al-Adhami, A.J.H., Bajraszewska, D., Fischer, P. and Peczynska-Czoch, W.** (1999) On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore. *J. Bacteriol.* **72**: 141-149.
- Otto, S., Cardinali, A., Marotta, E., Paradisi, C. and Zanin, G.** (2012) Effect of vegetative filter strips on herbicide runoff under various types of rainfall. *Chemosphere* **88**:113-119.
- Owens, D.K., Dhammika Nanayakkara, N.P. and Dayan, F.E.** (2013) *In planta* mechanism of action of leptospermone: Impact of its physico-chemical properties on uptake, translocation and metabolism. *J. Chem. Ecol.* **39**: 262-270.
- Pannacci, E. and Covarelli, G.** (2009) Efficacy of mesotrione used at reduced doses for post-emergence weed control in maize (*Zea mays* L.). *Crop Prot.* **28**: 57-61.
- Pearson, R.C., Riegel D.G. and Gadoury, D.M.** (1994) Control of powdery mildew in vineyards using single-application vapor-action treatments of triazole fungicides. *Plant Dis.* **78**: 164-168
- Pileggi, M., Veiga Pileggi, S.A., Olchanheski, L.R., Garbugio da Silva, P.A., Munoz Gonzalez, A.M., Koskinen, W.C., Barber, B. and Sadowsky, M.J.** (2012) Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. *Chemosphere* **86**: 1127-1132.
- Pino, N. and Penuela, G.** (2011) Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *Int. Biodeter. Biodegr.* **65**: 827-831.
- Playne, M.J. and Smith, B.R.** (1983) Toxicity of organic extraction reagents to anaerobic bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 1251-1265.
- Porwal, S., Lal, S., Cheema, S. and Kalia, V.C.** (2009) Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: Diversity in *Bacillus*. *Plos One* **4**: e4438.
- Potter, T.L., Strickland, T.C., Joo, H. and Culbreath, A.K.** (2005) Accelerated soil dissipation of tebuconazole following multiple applications to peanut. *J. Environ. Qual.* **34**: 1205-1213.
- Potts, K.T.** (1961) The chemistry of 1,2,4-triazoles. *Chem. Rev.* **61**: 87-127.
- Rasmussen, J.J., Monberg, R.J., Baattrup-Pedersen, A., Cedergreen, N., Wilberg-Larsen, P., Strobel, B. and Kronvang, B.** (2012) Effects of a triazole fungicide and a

- pyrethroid insecticide on the decomposition of leaves in the presence or absence of macroinvertebrate shredders. *Aquat. Toxicol.* **118-119**: 54-61.
- Reichling, J., Koch, C., Stahl-Biskup, E., Sojka, C. and Schnitzler, P.** (2005) Virucidal activity of a β -triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Med.* **71**: 1123-1127.
- Relyea, R.A.** (2004) Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**: 1737-1742.
- Roberts, T.R. and Hutson, D.H.** (1999) Metabolic pathways of agrochemicals. Part 2. Insecticides and fungicides. Cornwall, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Rouchaud, J., Neus, O., Eelen, H. and Bulcke, R.** (2000) Dissipation and mobility of the herbicide mesotrione in the soil of corn crops. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **65/2a**: 51-58.
- Ryckaert, B., Spanoghe, P., Haesaert, G., Heremans, B., Isebaert, S. and Steurbaut, W.** (2007) Quantitative determination of the influence of adjuvants on foliar fungicide residues. *Crop Prot.* **26**: 1589-1594.
- Saag, M.S. and Dismukes, W.E.** (1988) Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**: 1-8.
- Saison, C., Waller, N.J., Kumar, A. and Kookana, R.S.** (2009) Effects of thiobencarb in combinations with molinate and chlorpyrifos on selected soil microbial processes. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **44**: 226-234.
- Sancho, E., Villarroel, M.J., Andreu, E. and Ferrando, M.D.** (2009) Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. *Chemosphere* **74**: 1171-1178.
- Santel, H.-J.** (2009) Laudis® OD – a new herbicide for selective post-emergence weed control in corn (*Zea mays* L.) *Bayer CropScience J.* **62**: 95-108.
- Santra, S. and Baumann, U.** (2008) Experience of nitisone for the pharmacological treatment of hereditary tyrosinaemia type 1. *Expert Opin. Pharmacol.* **9**: 1229-1236.
- Schenzle, A., Lenke, H., Spain, J.C. and Knackmuss, H.-J.** (1999) 3-Hydroxylaminophenol mutase from *Ralstonia eutropha* JMP134 catalyzes a Bamberger rearrangement. *J. Bacteriol.* **181**: 4939-4343.
- Scherholz de Castro, V.L. and Chiorato, S.H.** (2007) Effects of separate and combined exposure to the pesticides methamidophos and chlorothalonil on the development of suckling rats. *Int. J. Environ. Health* **210**: 169-176.
- Sehnem, N.T., Souza-Cruz, P., Do Carmo, M., Peralba, R. and Záchia Ayub, M.A.** (2010) Biodegradation of tebuconazole by bacteria isolated from contaminated soils. *J. Environ. Sci. Heal. B* **45**: 67-72.
- Servizi, J.A., Gordon, R.W. and Martens, D.W.** (1987) Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia*, and trout. *Bull. Environ. Contam. Tox.* **39**: 15-22.

- Sheets, J.J. and Mason, J.L.** (1984) Ketoconazole: a potent inhibitor of cytochrome P-450-dependent drug metabolism in rat liver. *Drug Metab. Dispos.* **12**: 603-606.
- Silva, M.C.A., Monteggia, L.O., Leal, F.K. and Delabary, H.S.** (2012) Evaluation of anaerobic biodegradability of wastewater from tebuconazole manufacturing. *Water Sci. Technol.* **66**: 2299-2304.
- Singh, B.K., Walker, A. and Wright, D.J.** (2002) Degradation of chlorpyrifos, fenamiphos, and chlorothalonil alone and in combination and their effect on soil microbial activity. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**: 2600-2605.
- Skrzypczak, G.A., Sobiech, L. and Waniorek, W.** (2011) Evaluation of the efficacy of mesotrione plus nicosulfuron with additives as tank mixtures used for weed control in maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Protec. Res.* **51**: 300-305.
- Smith, A.E.** (1982) Herbicides and the soil environment in Canada. *Can. J. Soil Sci.* **62**: 433-460.
- Smits, T.H.M., Röthlisberger, M., Witholt, B. and Van Beilen, J.B.** (1999) Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Environ. Microbiol.* **1**: 307-317.
- Soltani, N., Sikkema, P.H. and Robinson, D.E.** (2007) Response of four market classes of dry bean to mesotrione soil residues. *Crop Protection* **26**: 1655-165.
- Sorensen, S.R., Ronen, Z. and Aamand, J.** (2001) Isolation from agricultural soil and characterization of a *Sphingomonas* sp. able to mineralize the phenylurea herbicide isoproturon. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5403-5409.
- Späth, R., Flemming, H.-C. and Wuertz, S.** (1998) Sorption properties of biofilms. *Water Sci. Technol.* **37**: 207-210.
- Srinivasulu, M. and Rangaswamy, V.** (2013) Influence of insecticides alone and in combination with fungicides on enzyme activities in soils. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **10**: 341-350.
- Stamatis, N., Hela, D. and Konstantinou, I.** (2010) Occurrence and removal of fungicides in municipal sewage treatment plant. *J. Hazard. Mater.* **175**: 829-835.
- Stavova, J., Sedgeman, C.A., Smith, Z.T., Frink, L.A., Hart, J.A., Niri, V.H. and Kubatova, A.** (2011) Method development for the determination of wood preservatives in commercially treated wood using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **702**: 205-212.
- Stojanovic, B.J., Kennedy, M.V. and Shuman, F.L. Jr.** (1972) Edaphic aspects of the disposal of unused pesticides, pesticide-wastes, and pesticide containers. *J. Environ. Qual.* **1**: 54-62.
- Strickland, T., Potter, T.L. and Joo, H.** (2004). Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation. *Pest Manag. Sci.* **60**: 703-709.
- Sun, J.Q., Huang, X., Chen, Q.L., Liang, B., Qiu, J.G., Ali, S.W. and Li, S.P.** (2009) Isolation and characterization of three *Sphingobium* sp. strains capable of degrading

- isoproturon and cloning of the catechol 1,2-dioxygenase gene from these strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 259-268.
- Sun, Y., Xu, Y., Sun, Y., Qin, X. and Wang, Q.** (2013) Dissipation and dynamics of mesotrione in maize and soil under field ecosystem. *Bull. Environ. Toxicol.* **90**: 242-247.
- Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Moon, J.-W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Phelps, T.J. and Doktycz, M.J.** (2010) Silver nanocrystallites: Biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **44**: 5210-5215.
- Sutton, P., Richards, C., Buren, L. and Glasgow, L.** (2002) Activity of mesotrione on resistant weeds in maize. *Pest Manag. Sci.* **58**: 981-984.
- Swarcewicz, M.K., Mulinski, Z. and Zbiec, I.** (1998) Influence of spray adjuvants on the behavior of trifluralin in the soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**: 569-576.
- Swarcewicz, M.K. and Gregorczyk, A.** (2012) The effects of pesticide mixtures on degradation of pendimethalin in soils. *Environ. Monit. Assess.* **184**: 3077-3084.
- Swarcewicz, M.K. and Gregorczyk, A.** (2013) Atrazine degradation in soil: effects of adjuvants and a comparison of three mathematical models. *Pest Manag. Sci.* DOI 10.1002/ps.3510.
- Taxvig, C., Hass, U., Axelstad, M., Dalgaard, M., Boberg, J., Andeasen, H.R. and Vinggaard, A.M.** (2007) Endocrine-disrupting activities *in vivo* of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicol. Sci.* **100**: 464-473.
- Taxvig, C., Vinggaard, A.M., Hass, U., Axelstad, M., Metzdorff, S. and Nellemann, C.** (2008) Endocrine-disrupting properties *in vivo* of widely used azole fungicides. *Int. J. Androl.* **2**: 170-177.
- Tejada, M.** (2009) Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere* **76**: 365-373.
- Ter Halle, A. and Richard, C.** (2006) Simulated solar light irradiation of mesotrione in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **40**: 3842-3847.
- Ter Halle, A., Lavieille, D. and Richard, C.** (2010) The effect of mixing two herbicides mesotrione and nicosulfuron on their photochemical reactivity on cuticular wax film. *Chemosphere* **79**: 482-487.
- Thompson, H. and Wilkins, S.** (2003) Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. *B. Insectol.* **56**: 131-134.
- Tomlin, C.D.S.** (2003) *The Pesticide Manual*, 13th ed; British Crop Protection Council: Alton, U.K.
- Toni, C., Ferreira, D., Kreutz, L.C., Loro, V.L. and Barcellos, L.J.G.** (2011) Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. *Chemosphere* **83**: 579-584.

- Trudgill, P.W., Widdus, R. and Rees, J.S.** (1971) Effects of organochlorine insecticides on bacterial growth, respiration and viability. *J. Gen. Microbiol.* **69**: 1-13.
- UIPP** (Union des Industries pour la Protection des Plantes). Rapport d'activité 2011-2012.
- Valiente Moro, C., Bricheux, G., Portelli, C. and Bohatier, J.** (2012) Comparative effects of the herbicides chlortoluron and mesotrione on freshwater microalgae. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**: 778-860.
- Van Almsick, A., Benet-Buchholz, J., Olenik, B. and Willms, L.** (2009) Tembotrione, a new exceptionally safe cross-spectrum herbicide for corn production. *Bayer Crop Science J.* **62**: 5-16.
- Van Klink, J.W., Larsen, L., Perry, N.B., Weavers, R.T., Cook, G.M., Bremer, P.J., Mackenzie, A.D. and Kirika, T.** (2005) Triketones active against antibiotic-resistant bacteria: synthesis, structure-activity relationships and mode of action. *Bioorg. Med. Chem.* **13**: 6651-6662.
- Van Waasbergen, L.G., Hildebrand, M. and Tebo, B.M.** (1996) Identification and characterization of a gene cluster involved in manganese oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp strain SG-1. *J. Bacteriol.* **178**: 3517-3530.
- Viegas, C.A., Costa, C., André, S., Viana, P., Ribeiro, R. and Moreira-Santos, M.** (2012) Does S-metolachlor affect the performance of *Pseudomonas* sp. Strain ADP as bioaugmentation bacterium for atrazine-contaminated soils? *PlosOne* **7**: e37140.
- Vyn, J.D., Swanton, C.J., Weaver, S.E. and Sikkema, P.H.** (2006) Control of *Amaranthus tuberculatus* var. *rudis* (common waterhemp) with pre and post-emergence herbicides in *Zea mays* L. (maize). *Crop Prot.* **25**: 1051-1056.
- Walsh, T.J., Anaissie, E.J., Denning, D.W., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D.P., Marr, K.A., Morrison, V.A., Segal, B.H., Steinbach, W.J., Stevens, D.A., van Burik, J.A., Wingard, J.R. and Patterson, T.F.** (2008) Treatment of Aspergillosis: clinical practice guidelines of the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* **46**: 327-360.
- Wang, H.-P., Liang, Y.-J., Sun, Y.-J., Chen J.-X., Hou, W.-Y., Long, D.-X. and Wu, Y.-J.** (2013) ¹H NMR-based metabonomic analysis of the serum and urine of rats following subchronic exposure to dichlorvos, deltamethrin, or a combination of these two pesticides. *Chem.-Biol. Interact.* **203**: 588-596.
- Whaley, C.M., Armel, G.R., Wilson, H.P. and Hines, T.E.** (2006). Comparisons of mesotrione combinations with standard weed control programs in corn. *Weed Technol.* **20**: 605-611.
- White, P.M., Potter, T.L. and Culbreath, A.K.** (2010) Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics. *Sci. Total Environ.* **408**: 1393-1402.
- Willetts, A.J.** (1974) Microbial metabolism of alkylbenzene sulphonates. Effect of a methyl-branching of the alkyl side chain on oxidation by a *Bacillus* species. *Antonie van Leeuwenhoek* **40**: 561-575.

- Wilson, J.S. and Foy, C.L.** (1990) Weed control in no-tillage and conventional corn (*Zea mays*) with ICIA-0051 and SC-0774. *Weed Technol.* **4**: 731-738.
- Wo, K. and Love, N.G.** (2011) Sorption of carbamazepine, 17 α -ethinylestradiol, iopromide and trimethoprim to biomass involves interactions with exocellular polymeric substances. *Chemosphere* **82**: 917-922.
- Woo, C., Daniels, B., Stirling, R. and Morris, P.** (2010) Tebuconazole and propiconazole tolerance and possible degradation by Basidiomycetes: A wood-based bioassay. *Int. Biodeter. Biodegr.* **64**: 403-408.
- Wyss-Benz, M. and Tschech, A.** (1995) [1-¹⁴C] N,N-Dimethyldecanoic acid amide: Degradation and metabolism in one U.S. soil, incubated under aerobic conditions. RCC Umweltchemie AG, Study Project No. RCC Project 340334.
- Xing, B., Pignatello, J.J. and Gigliotti, B.** (1996) Competitive sorption between atrazine and other organic compounds in soils and model sorbents. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 2432-2440.
- Ye, J., Singh, A. and Ward, O.P.** (2004) Biodegradation of nitroaromatics and other nitrogen-containing xenobiotics. *World J. Microb. Biotechnol.* **20**: 117-135.
- Zarn, J.A., Brüschweiler, B.J. and Schlatter, J.R.** (2003) Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* **111**: 255-261.
- Zhou, Y., Li, L., Lin, K., Zhu, X. and Liu, W.** (2009) Enantiomer separation of triazole fungicides by high-performance liquid chromatography. *Chirality* **21**: 421-427.
- Zhu, W., Qiu, J., Dang, Z., Lv, C., Jia, G., Li, L. and Zhu, Z.** (2007) Stereoselective degradation kinetics of tebuconazole in rabbits. *Chirality* **19**: 141-147.

